การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากต้นหม่อน

PARTIAL PURIFICATION OF *MORUS ALBA* ROOT EXTRACTS

พรรณภัทร ช้างป่าดี

สุพิชญา สุภาวะ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PARTIAL PURIFICATION OF *MORUS ALBA* ROOT EXTRACTS

PHANNAPHAT CHANGPADEE
SUPITCHAYA SUPAWA

SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากต้นหม่อน

Partial purification of *Morus alba* root extracts

ชื่อนักศึกษา นางสาว พรรณภัทร ช้างป่าดี รหัสนักศึกษา 62050518

นางสาว สุพิชญา สุภาวะ รหัสนักศึกษา 62050548

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
รศ.ดรสรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากต้นหม่อน
Partial purification of *Morus alba* root extracts
ชื่อนักศึกษา นางสาว พรรณภัทร ช้างป่าดี รหัสนักศึกษา 62050518
นางสาว สุพิชญา สุภาวะ รหัสนักศึกษา 62050548
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ที่ได้จากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยเก็บรากทุกๆ เดือนเป็นระยะเวลา 7 เดือน พบว่ามีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุด 8.89 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของราก การเปรียบเทียบปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 1/4 MS ที่เสริมฮอร์โมน NAA หรือIBA ความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ารากที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เสริมฮอร์โมนNAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุด 10.97 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของราก การศึกษาอิทธิพลของสารประกอบAmmonium nitrate หรือ Potassium nitrate หรือ Potassium dihydrogen phosphate ที่เสริมลงในอาหาร 1/4MS ความเข้มข้น 10 หรือ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหาร 1/4MS ที่เสริม Potassium nitrate 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณมัลเบอร์โรไซด์เอสูงที่สุด 11.09 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของราก

การทำบริสุทธิ์บางส่วนจากสารสกัดของรากหม่อนโดยวิธีFlash column chromatography ด้วยโมบายเฟส เฮกเซน, เอทิลอะซิเตท, เอทานอล, 50%เอทานอล และ น้ำ ตามลำดับ พบว่า โมบายเฟส 50%เอทานอล มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุด 1,414 PPM

การทำบริสุทธิ์บางส่วนจากสารสกัดของรากหม่อนโดยวิธี classical absorption column chromatography ด้วยโมบายเฟส 1:3 เอทานอล : เอทิล อะซิเตท พบว่ามีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุด 72.37 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัดรากหม่อน

คำสำคัญ : หม่อน, มัลเบอรี่, มัลเบอร์โรไซด์เอ, การทำบริสุทธิ์บางส่วน, เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Partial purification of *Morus alba* root extracts

Students Miss Phannaphat Changpadee Student 62050518

Miss Supitchaya Supawa Student 62050548

Degree Bachelor of Science (Biotechnology)

Department Biology

School Science

University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2022

Advisor Asst. Prof. Dr. Pana Lohasupthawee

Abstract

This special project aims to study the amount of mulberroside A obtained from mulberry roots cultured in hydroponics system with 1/4MS medium by collecting the roots every month for a period of 7 months. The maximum amount of mulberroside A in the 3rd month was 8.89 mg/g dry roots. When comparing the amount of mulberroside A in mulberry roots cultured in 1/4 MS medium supplemented with NAA or IBA at concentrations of 0.25, 1, and 4 mg/L , it was found that the roots cultured in 1/4 MS medium with 4 mg/L NAA exhibited the highest amount of mulberroside A 10.97 mg/g dry roots. In a study on the influence of additives such as Ammonium nitrate, Potassium nitrate, or Potassium dihydrogen phosphate in 1/4 MS medium at concentrations of 10 or 40 mg/L, it was found that in 1/4 MS medium supplemented with Potassium nitrate at 40 mg/L, the highest amount of mulberroside A was observed (11.09 mg/g dry roots).

The mulberry root extract was partially purified by using flash column chromatography with the following mobile phases: hexane, ethyl acetate, ethanol, 50% ethanol, and water, respectively. It was found that 50%Ethanol gave the highest amount of mulberroside A (1,414 ppm). The mulberry root extract was partially purified by using classical absorption column chromatography with a mobile phase of 1:3 Ethanol : Ethyl Acetate. It was found that the highest amount of mulberroside A was 72.37 mg/g dry extracts.

Keyword: *Morus alba* Linn., Mulberry, mulberroside A, partial purification, HPLC

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานฉบับพิเศษนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่านที่ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษา สอนเทคนิคและวิธีการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ และให้ประสบการณ์ที่ดีในการทำโครงงานพิเศษนี้แก่คณะผู้จัดทำ รวมทั้งช่วยตรวจสอบและช่วยแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ รศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อมาเป็นคณะกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ รวมทั้งให้คำชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงาน ทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้

ขอกราบขอบพระคุณ นางสาว ณัฐวรา ดำรงมงคลกุล นักศึกษาปริญญาโท ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาถ่ายทอดความรู้ในการทำโครงงานพิเศษแก่คณะผู้จัดทำ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในโครงงานพิเศษและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ คณะผู้จัดทำขออุทิศโครงงานพิเศษนี้ไว้เป็นแหล่งค้นคว้า อ้างอิง ให้ความรู้กับผู้ที่สนใจในอนาคตต่อไป หากมีข้อผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำ ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

พรรณภัทร ช้างป่าดี

สุพิชญา สุภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ประวัติและความเป็นมาของต้นหม่อน 3
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 3
2.2.1 ลักษณะของต้นหม่อน 3
2.2.2 ลักษณะของใบหม่อน 4
2.2.3 ลักษณะของดอกหม่อน 4
2.2.4 ลักษณะของผลหม่อน 5
2.2.5 ลักษณะของรากหม่อน 5
2.3 สารสำคัญในหม่อน 6
2.3.1 สารกลุ่มแอลคาลอยด์ 6
2.3.2 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 6
2.3.3 สารกลุ่มสติลบีนอยด์ 6
2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา 7
2.4.1 ฤทธิ์ต้านไวรัส (anti-viral activity) 7
2.4.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxic activity) 7
2.4.3 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase activity) 7
2.4.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity) 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) 8
2.4.6 สารมัลเบอร์โรไซด์เอ 8
2.5 การสกัด 9
2.5.1 ประเภทของการสกัดด้วยตัวทำละลาย 10
2.5.2 สกัดสารด้วยวิธี Soxhlet extraction 11
2.5.3 หลักการการสกัดซอกห์เลต 11
2.5.4 ตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด 11
2.5.5 สกัดสารด้วยวิธี Reflux extraction 12
2.5.6 ขั้นตอนการทำรีฟลักซ์ 13
2.6 Column Chromatography 14
2.6.1 คอลัมน์ Liquid chromatography 15
2.6.2 เทคนิคของลิควิดโครมาโทกราฟี 15
2.6.2.1. โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ 15
2.6.2.2 โครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน 17
2.6.2.3. โครมาโทกราฟีแบบการแลกเปลี่ยนไอออน 18
2.6.2.4. โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน 19
2.6.2.5. โครมาโทกราฟีแบบแฟลชคอลัมน์ 19
2.6.2.6. โครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง 19
2.6.2.7. High Performance Liquid Chromatography 21
2.6.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 25
3.1 พืชที่ใช้ 25
3.2 สารเคมีที่ใช้ 25
3.3 อุปกรณ์ 25
3.4 วิธีดำเนินการ 26
3.4.1 การศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตร 1/4MS ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน 26
3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น ¼MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA หรือ IBA ต่อการเจริญของรากและปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อนระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate, Potassium nitrate, Potassium dihydrogen phosphate ต่อการเจริญของรากและสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน..... 30
3.4.4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากของต้นหม่อนด้วยวิธี Column Chromatography 30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 34
4.1 การศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตร1/4MS ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน 34
4.2 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA, IBA ต่อการเจริญของรากและปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน 36
4.2.1 การศึกษาGrowth indexของต้นหม่อนในอาหาร1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA เปรียบเทียบกับฮอร์โมนIBA ที่มีความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ระยะเวลา 1 เดือน..... 37
4.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate, Potassium nitrate, Potassium dihydrogen phosphate ต่อการเจริญของราก และสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน 40
4.3.1 การศึกษาGrowth indexของต้นหม่อนในอาหาร1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้น 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน..... 42
4.4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) 45
4.5 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) 46
4.6 การคัดเลือกโมบายเฟสด้วยวิธี Thin layer chromatography 48
4.7 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)..... 49
4.8 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟส เป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate) และ 50% เอทานอล (50%Ethanol) 50

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... เนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 52
5.1 สรุปผลการทดลอง 52
5.1.1 การศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตร1/4MS ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน 52
5.1.2 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA,IBA ต่อการเจริญของรากและปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน 52
5.1.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ต่อการเจริญของรากและสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน 53
5.1.4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) 54
5.1.5 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water)ตามลำดับ 54
5.1.6 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography เป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) 55
5.1.7 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) และ 50%เอทานอล (50%Ethanol) 55
5.2 ข้อเสนอแนะ 56
เอกสารอ้างอิง 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 ตัวดูดซับที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ 16
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของตัวทำละลาย 17
ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอและน้ำหนักแห้งของรากต้นหม่อน ทุก ๆ เดือน ระยะเวลา 7 เดือน 34
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1/4 MSที่เพิ่มฮอร์โมน NAAและIBA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน 36
ตารางที่ 4.2.1 ค่าเฉลี่ย Growth index ของต้นหม่อนในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA เปรียบเทียบกับฮอร์โมน IBA ที่มีความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ระยะเวลา 1 เดือน 38
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร1/4 MS ที่เพิ่มสารประกอบ ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน 41
ตารางที่ 4.3.1 ค่าเฉลี่ย Growth indexของต้นหม่อนในอาหาร1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3) และPotassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้น 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน 43
ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ โดยใช้โมบายเฟส เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ด้วยวิธี Flash column chromatography 45
ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอโดยใช้โมบายเฟส เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ด้วยวิธี Flash column chromatography 47
ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบอัตราส่วนของโมบายเฟส 48
ตารางที่ 4.7 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่อยู่ในขวดเก็บตัวอย่างจากการผ่านคอลัมน์วิธี Classical adsorption column chromatography โดยโมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) 49
ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่อยู่ในขวดเก็บตัวอย่างจากการผ่านคอลัมน์วิธี Classical adsorption column chromatography โดยโมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) และ 50%เอทานอล (50%Ethanol) 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นหม่อน 3
รูปที่ 2.2 ลักษณะของใบหม่อน 4
รูปที่ 2.3 ลักษณะของดอกหม่อน 4
รูปที่ 2.4 ลักษณะผลของหม่อน..... 5
รูปที่ 2.5 ลักษณะรากของหม่อน 5
รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์สารมัลเบอร์โรไซด์ 9
รูปที่ 2.7 ลักษณะการสกัดแบบใช้เครื่องสกัดสกัดสารด้วยซอกห์เลต (Soxhlet extractor)..... 11
รูปที่ 2.8 การสกัดด้วยวิธี Reflux extraction 14
รูปที่ 4.1.1 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4 MS ทุกๆเดือน ระยะเวลา 7 เดือน 35
รูปที่ 4.1.2 น้ำหนักแห้งต่อต้นที่เลี้ยงในอาหาร 1/4 MS ทุกๆเดือนระยะเวลา 7 เดือน..... 35
รูปที่ 4.2.1 ปริมาณของสารมัลเบอร์โรไซด์เอของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่มฮอร์โมน NAAและIBA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน..... 37
รูปที่ 4.2.2 น้ำหนักแห้งของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่มฮอร์โมน NAAและIBA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน 37
รูปที่ 4.2.3 ลักษณะที่ของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA เปรียบ-เทียบกับฮอร์โมน IBA ที่มีความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในระบบไฮโดร-โปนิกส์ระยะเวลา 1 เดือน 39
รูปที่ 4.3.1 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4 MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน..... 41
รูปที่ 4.3.2 น้ำหนักแห้งของรากต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร1/4 MS ที่เพิ่มสารประกอบ ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน 42
รูปที่ 4.3.3 ลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3) และPotassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้น 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน .. 44
รูปที่ 4.4 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยาที่ใช้โมบายเฟส เฮกเซน(ก) , เอทิล อะซิเตท(ข) , เอทานอล(ค) , 50%เอทานอล(ง) , น้ำครั้งที่1(จ) และ น้ำครั้งที่2(ฉ) ตามลำดับ..... 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยาที่ได้จาก ตะกอนที่ได้จากเอทานอล(ก) , ตะกอนที่ได้จาก50%เอทานอล(ข) , ตะกอนที่ได้จากน้ำ(ค) , เอาทานอล(ง) , 50%เอาทานอล(จ) และ น้ำ(ฉ) ตามลำดับ..... 47
รูปที่ 4.6 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Classical adsorption column chromatography โดยโมบายเฟส 1 : 3 เอทานอล : เอทิล อะซิเตท 50
รูปที่ 4.7 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Classical adsorption column chromatography โดยโมบายเฟส 1 : 3 เอทานอล : เอทิล อะซิเตท และ 50%เอาทานอล..... 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MS	Murashige and Skoog mediumue
NAA	Naphthyl Acetic Acid
IBA	Indole-3-butyric acid
TLC	Thin-Layer chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HCl	hydrochloric acid
NaCl	Sodium Chloride
KCl	Potassium Chloride
PPM	parts per million หรือส่วนต่อล้าน (หน่วย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หม่อน (*Morus alba* Linn.) หรือมัลเบอร์รี่ (Mulberry) เป็นพืชสมุนไพรวงศ์ Moraceae เป็นพืชไม้ยืนต้นประเภทไม้พุ่มขนาดกลาง เป็นไม้เนื้ออ่อนเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตร้อน นิยมปลูกมากทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เป็นอาหารตามธรรมชาติชนิดเดียวของหนอนไหม มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูง ส่วนต่าง ๆ ของหม่อนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน เช่น ผลมีรสเปรี้ยวหวานนำมารับประทานเป็นผลไม้ ใบหม่อนนำมาทำเป็นชา มีฤทธิ์แก้อาการไอ เจ็บคอ แก้ร้อนในกระหายน้ำ เป็นยาขับเหงื่อ บำรุงตับ ไต และใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง เปลือกกิ่ง และรากของหม่อนสามารถนำมาทำเป็นยาสมุนไพร ยาขับพยาธิ เป็นต้น หม่อนยังเป็นแหล่งของสารประกอบทางเคมีในธรรมชาติหลายชนิด เช่น อัลคาลอยด์ (Alkaloid), ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และสติลบีนอยด์ (Stilbenoid) ในการศึกษานี้เราได้สนใจสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (Mulberroside A) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสติลบีนอยด์ (Stibenoid) ที่พบได้ในหม่อน อยู่ในรูปไกลโคไซด์ (Glycosides) เป็นวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) มีหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) คือออกซิเจนและส่วนที่เป็นไกลโคไซด์ (Glycosides) เมื่อสารมัลเบอร์โรไซด์เอเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนโครงสร้างเป็นออกซีเรสเวอราทรอล (Oxyresveratrol) จากรายงานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหม่อน พบว่า สารมัลเบอร์โรไซด์เอในหม่อนมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในการต้านไวรัส, ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ต้านการอักเสบ, ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดระดับไขมันในเลือด เนื่องจากคุณสมบัติทางฤทธิ์เภสัชวิทยาที่ดีของหม่อนจึงเป็นสารที่ต้องการทางการแพทย์ สามารถใช้เป็นยาทางเลือกได้และยังสามารถนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพได้ (ยลดา และคณะ, 2559) หม่อนในธรรมชาติใช้เวลาในการเจริญเติบโตนาน จึงทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของหม่อนเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้ได้มาก ๆ ในระยะเวลาอันสั้นและมีการเพาะเลี้ยงด้วยระบบไฮโดรโปรนิกส์เพื่อศึกษา Growth index ของรากหม่อนในแต่ละเดือน และเพื่อศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในส่วนของรากทุก ๆ เดือนในระยะเวลา 7 เดือน

โครงงานพิเศษนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการนำรากของต้นหม่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยระบบไฮโดรโปรนิกส์ มาทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากของต้นหม่อนโดยการนำวิธี column chromatography โดยใช้โมบายเฟส เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water), จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอด้วย High performance liquid chromatography (HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้จากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ทุก ๆ เดือน ระยะเวลา 7 เดือน

2. เพื่อศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากต้นหม่อนโดยการนำวิธี Flash column chromatography และ Classical adsorption column chromatography มาใช้ในการแยกสารมัลเบอร์โรไซด์เอ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (Mulberroside A) ที่ได้จากการนำวิธี Flash column chromatography และ Classical adsorption column chromatography มาใช้ในการแยกสารมัลเบอร์โรไซด์เอออกจากสารสกัดจากรากหม่อน โดยใช้โมบายเฟส เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water), โดยจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบปริมาณมัลเบอร์โรไซด์เอในรากหม่อนที่เลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกด้วยอาหาร 1/4 MS ทุกเดือน ในระยะเวลา 7 เดือน

2. สามารถทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากของต้นหม่อนได้ และสามารถแยกสารมัลเบอร์โรไซด์เอได้

3. สามารถทราบถึงวิธีการแยกสารมัลเบอร์โรไซด์เอจากสารสกัดจากรากของต้นหม่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติและความเป็นมาของต้นหม่อน (วิโรจน์, 2555)

หม่อน (Mulberry) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Morus alba* Linn อยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นไม้ยืนต้น คนไทยรู้จักชื่อของหม่อนซึ่งเป็นพืชเมืองร้อนมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบเอเชียอยู่ในกลุ่มเดียวกับตระกูลเบอร์รี่ เช่น ราสเบอรี่ และ บลูเบอรี่ การนำต้นหม่อนเข้ามาปลูกในไทยเริ่มตั้งแต่ต้นสมัยรัตนโกสินทร์ เนื่องจากปรากฏหลักฐานว่า พ.ศ.2446 ได้มี “กรมช่างไหม” ซึ่งอยู่ในรัชกาลที่ 5 นอกจากนี้ในประเทศไทยยังนิยมปลูกหม่อนมากในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันได้มีการทำวิจัยและพัฒนางานวิจัยการแปรรูปหม่อนเพื่อใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่น นำกิ่งหม่อนไปย่อยทำเป็นวัสดุเพาะเห็ด

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหม่อน (Pawlowsk et al., 2008)

2.2.1 ลักษณะของต้นหม่อน

หม่อน จัดเป็นไม้พุ่ม สูงประมาณ 2-7 เมตร แตกกิ่งก้านมาก ต้นแก่เปลือกสีน้ำตาล มีเส้นรอยแตกที่เปลือกผิว (รูปที่ 2.1)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นหม่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ลักษณะของใบหม่อน

ใบหม่อน มีลักษณะใบเดี่ยวเป็นใบรูปไข่ขอบเรียบหยักเป็นริ้วเล็กน้อย ปลายเรียวแหลมยาว ฐานใบกลมหรือรูปหัวใจ แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มเรียบเงาใต้ใบสีเขียวอ่อนใบค่อนข้างหนาสากใบ จะร่วงในฤดูใบไม้ร่วง (รูปที่ 2.2)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของใบหม่อน

2.2.3 ลักษณะของดอกหม่อน

มีลักษณะเป็นดอกช่อ แยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน ช่อดอกเพศผู้ และช่อดอกเพศเมียอยู่ต่างช่อกัน จะมีช่อดอกเกิดที่ตาเหนือใบของตาข้างของกิ่ง วงกลีบรวมสีครีมอมเขียวประมาณ 2 เซนติเมตร ดอกย่อยมีขนาดเล็ก (รูปที่ 2.3)

รูปที่ 2.3 ลักษณะของดอกหม่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 ลักษณะของผลหม่อน

ผลหม่อนเป็นผลที่เกิดจากช่อดอก เป็นผลรวมอยู่ในกระจุกเดียวกันโดยจะออกตามซอกใบ ลักษณะของผลเป็นรูปทรงกระบอกยาวประมาณ 1-2.5 เซนติเมตร ผลเป็นสีเขียว เมื่อผลสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง เข้ม เกือบดำ เนื้อนิ่ม ฉ่ำน้ำ และมีรสหวานอมเปรี้ยว (รูปที่ 2.4)

รูปที่ 2.4 ลักษณะผลของหม่อน

2.2.5 ลักษณะของรากหม่อน

รากเป็นระบบรากแก้วมีลักษณะกลมๆ แทงลึกลงในดินมีรากแขนง และรากฝอยเล็ก ๆ ออกตามแนวราบ มีสีน้ำตาลอมแดง (รูปที่ 2.5)

รูปที่ 2.5 ลักษณะรากของหม่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สารสำคัญในหม่อน (ยศพณ, 2564)

สารสำคัญที่พบได้ในหม่อนมีอยู่ 3 กลุ่มหลักๆ ดังนี้ 1. สารกลุ่มแอลคาลอยด์ ได้แก่ Calystegin B-2,1 Deoxy ribitol fagomine, Nojirimycin, Zeatin riboside 2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ Albafuran C, Astragalin, Aromadendrin, Chalcomoracin, Kaempferol, Kuwanol, Kuwanon, Quercetin, Quercitrin, Moracetin, Morin, Rutin และ 3. สารกลุ่มคูมาริน ได้แก่ Bergapten, Marmesin, Scopoletin, Umbelliferone, Adenine, Amylase, Choline, Crocarotene, Isoquercutrin, Succinic acid, Trigonelline, วิตามินเอ, วิตามินบี, วิตามินบี 2, วิตามินซี, แร่ธาตุแคลเซียม, กลูโคส และ แทนนิน เป็นต้น

2.3.1 สารกลุ่มแอลคาลอยด์ (อรัญญา, 2557)

สารกลุ่มแอลคาลอยด์ในหม่อนนั้นมีลักษณะโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เรียกสาร Azasugars mujr โดยในสารชนิดนี้จะมีสาร DNJ ที่มีมากถึง 50% ของ สาร Azasugars mujr ประโยชน์ของสาร DNJ สามารถลดน้ำตาลในเลือดได้ เนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-Glucosidase ที่ทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดนั้นลดลง

2.3.2 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (วิภพ, 2556)

สารฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มของ โพลีฟีนอล ในส่วนใหญ่จะสามารถพบได้ใน ผัก ผลไม้ เครื่องดื่มบางชนิด เช่น ชา ไวน์ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารฟลาโวนอยด์นั้นสามารถช่วยต้านอนุมูลอิสระ หรือต่อต้านการเกิดมะเร็งได้ โดยจะเป็นการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง สามารถต้านโรคเบาหวาน ลดการอักเสบ และสามารถปรับสมดุลระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้

2.3.3 สารกลุ่มสติลบีนอยด์ (จักรพันธ์และคณะ, 2013)

สารกลุ่มสติลบีนอยด์เป็นสารประกอบกลุ่มฟีโนลิก พบได้มากในหม่อน ได้แก่ มัลเบอร์โรไซด์ เอ เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในรากของหม่อน เปลือกไม้ ลำต้น และยังสามารถออกซีเรสเวอราทรอล ได้ในส่วนต่างๆของหม่อน โดยสารกลุ่มนี้จะมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.4.1. ฤทธิ์ต้านไวรัส (anti-viral activity)

มีการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสเริมของออกซีเรสเวอราทรอลที่สกัดได้จากสารสกัดหยาบส่วนเมทานอลของแก่นไม้มะหาด โดยหนูที่ได้รับออกซีเรสเวอราทรอล จะพบว่ารอยโรคผิวหนังหลังจากได้รับเชื้อไวรัสเริมนั้นเริ่มดีขึ้น ลักษณะการหายของแผลมีความใกล้เคียงกับหนูที่ได้รับอะไซโคลเวีย (Chuanasa et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องการศึกษาของ (Lipipun el al., 2011) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสเริมของออกซีเรสเวอราทรอลในหนู

2.4.2. ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxic activity) (ยลดา และคณะ, 2559)

ออกซีเรสเวอราทรอลเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำทั้งในเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็ง สารนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร อาหารเสริม ยา และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง แต่ถ้าออกซีเรสเวอราทรอลถูกเปลี่ยนให้มีโครงสร้างแบบซิส (cis-form) โดย O-methylation จะกลายเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ อีกทั้งอนุพันธ์แบบ tetra-O-methylated ของ cis-oxyresveratrol พบว่ามีความเป็นพิษ และสามารถต้านเซลล์มะเร็งของมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Likhitwitayawuid et al., 2006) ที่ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของออกซีเรสเวอราทรอลที่สกัดได้จากสารสกัดหยาบส่วนน้ำของแก่นไม้มะหาดหลังจากถูกเปลี่ยนให้มีโครงสร้างแบบซิสเรียกว่าcis-2,4,3,5,- tetramethoxystilbene โดยศึกษาการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งปอด ด้วยวิธี Resazurin microplate assay

2.4.3. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase activity)

ออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเม็ดสีหมองคล้ำในส่วนของผิวหนัง ผม และตา โดยออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์นี้ได้ดีเนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิล และยังพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ดีกว่ากรดโคจิก (kojic acid) สามารถช่วยทำให้ผิวขาว และถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม อีกทั้งการเกิดปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) จะทำให้ออกซีเรสเวอราทรอลมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใหม่ ซึ่งทำให้มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีขึ้น (Likhitwitayawuid et al., 2006) เกี่ยวข้องกับการศึกษาของ (Kim et al., 2010) ซึ่งศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองด้วยวิธี Dopachrome method ของสารมัลเบอร์โรไซด์เอ และออกซีเรสเวอราทรอลที่สกัดได้จากสารสกัดหยาบส่วนเอทานอลของรากหม่อน พบว่า ออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารมัลเบอร์โรไซด์เอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant activity)

การมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมากในโครงสร้างของออกซีเรสเวอราทรอล ทำให้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นได้ อีกทั้งคุณสมบัติการซึมผ่านผนังกั้นหลอดเลือดสมอง จึงทำให้ออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทได้ (Chang et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Zhang et al., 2008) ที่ศึกษาผลของออกซีเรสเวอราทรอลที่สกัดได้จากสารสกัดหยาบส่วนเอทานอลของกิ่งหม่อนต่อการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการวัดสมรรถนะของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ และระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น (lipidperoxidation) โดยเทคนิค Thiobarbituric acid reactive substance (TBARs) ในตับของหนูสายพันธุ์ ICR ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นด้วยการให้เอทานอล กลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ ไซลิมาริน (silymarin) พบว่าออกซีเรสเวอราทรอลสามารถเพิ่มสมรรถนะของสารต้านอนุมูลอิสระในตับหนูที่ได้รับเอทานอล ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (superoxide dismutase), คะตาเลส (catalase) และ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) แล้วสามารถลดระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตับหนูที่ได้รับเอทานอลได้

2.4.5. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity)

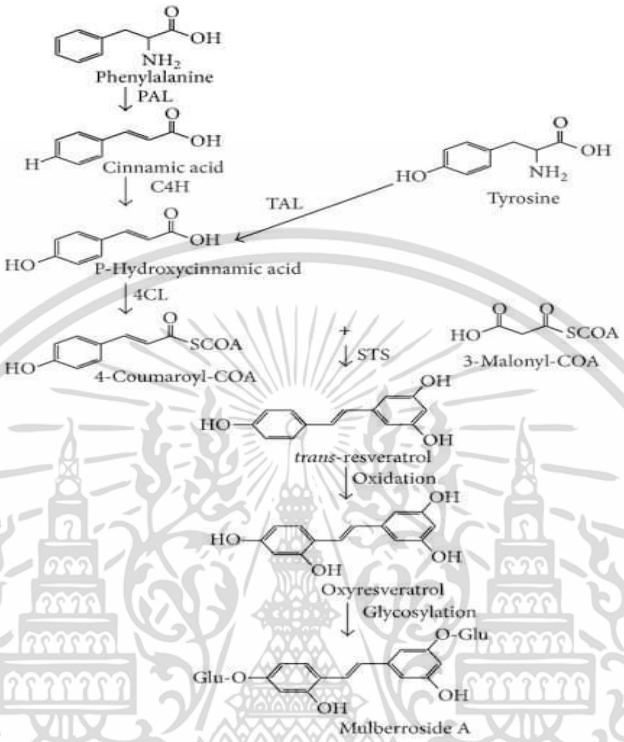
การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในกลุ่มสติลบีนอยด์ของออกซีเรสเวอราทรอลที่สกัดได้จากสารสกัดหยาบส่วนเมทานอลของผลสุกแห้งของขนุนในเซลล์มาโครเฟจ ที่ถูกกระตุ้นการสร้าง NO พบว่าออกซีเรสเวอราทรอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่สามารถยับยั้งการเกิด NO ได้ (Yen et al., 2008) ขณะที่การศึกษาของ (Shi and Zhang, 2010) ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของมัลเบอร์โรไซด์เอที่สกัดได้จากสารสกัดหยาบส่วนเมทานอลของกิ่งหม่อน โดยวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยกลุ่มควบคุมเชิงบวกได้รับอินโดเมธาซิน พบว่ามัลเบอร์โรไซด์เอ สามารถลดการอักเสบได้

2.4.6 สารมัลเบอร์โรไซด์เอ (Zhou et al., 2013)

การสังเคราะห์สารมัลเบอร์โรไซเอ เกิดจาก Phenylalanine ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาคือ Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) เกิดเป็น Cinnamic acid มี Tyrosine ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยา tyrosine ammonia lyase (TAL) มารวมกับ Cinnamic acid เกิดเป็น P-Hydroxycinnamic acid มี 4CL เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็น 4-Coumaroyl-COA รวมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3- Maroyl-COA ซึ่งมีตัวเร่งเป็น STS เป็น trans-resveratrol เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้เป็น Oxyresveratrol และเกิดปฏิกิริยา Glycosylation เกิดเป็น Mulberroside A ดัง รูป 2.6



รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์ Mulberride A

2.5 การสกัด (ศิริวัลย์, 2564)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย คือการแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายระหว่างตัวทำละลายกับสารสำคัญในสมุนไพร วิธีนี้จะอาศัยความมีขั้ว (Polarity) ของทั้งตัวทำละลายและสารสำคัญ โดยสารสำคัญจะสามารถละลายในตัวทำละลายได้ก็ต่อเมื่อความเป็นขั้วของตัวสารสำคัญกับโมบายเฟสมีค่าใกล้เคียงกัน (Like Dissolves Like) คือตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลมีขั้ว เป็นแรงไดโพล-ไดโพล (Dipole-Dipole) ในทางตรงข้ามตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นแรงแวนเดอวาลส์ (Van der Waals Force) เหมือนกัน วิธีการนี้จะนิยมใช้สกัดสีจากธรรมชาติในสมุนไพร สกัดน้ำมันหอมระเหย เป็นวิธีการที่ประหยัด และปลอดภัย วิธีนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 ประเภทของการสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลายมีหลายวิธี เช่น วิธีการแช่หมัก (Maceration), วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation), การสกัดแบบใช้คลื่นเสียง (Ultrasonic extraction) และการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave extraction) เป็นต้น โดยการเลือกตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการสกัดมีหลักทั่วไป ดังนี้

1. เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อสกัดให้ได้สารที่ต้องการออกมามากและต้องมีสิ่งเจือปนติดน้อยที่สุด

2. ต้องเลือกตัวทำละลายที่ละลายสารใดสารหนึ่งได้มากและอีกสารได้น้อยมากเพื่อให้เจือปนกันน้อยที่สุด

3. แยกสารที่ไม่ต้องการออกไปและแยกสารที่ต้องการออกจากตัวทำละลาย

4. ถ้าต้องการแยกสี ตัวทำละลายจะต้องไม่มีสี ถ้าต้องการแยกกลิ่น ตัวทำละลายต้องไม่มีกลิ่น

5. ไม่มีพิษ มีจุดเดือดต่ำและแยกตัวออกจากสารที่ต้องการสกัดได้ง่าย

6. ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกับสารที่นำมาสกัด มีราคาถูก

ซึ่งในการสกัดสารจากพืชสมุนไพร มีตัวอย่างตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารสำคัญดังต่อไปนี้

1. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นตัวทำละลายที่ดีแต่มี selectivity น้อยเกิด emulsion ง่าย ถ้าใช้สารสกัดซึ่งเป็นด่างแก่อาจจะสลายตัวให้กรดเกลือ

2. อีเธอร์ (Ether) มีอำนาจในการละลายน้อยกว่า คลอโรฟอร์ม แต่มี selectivity ดีกว่าคลอโรฟอร์ม ข้อเสียคือระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิด oxide ได้ง่าย และดูดน้ำได้ดีมาก

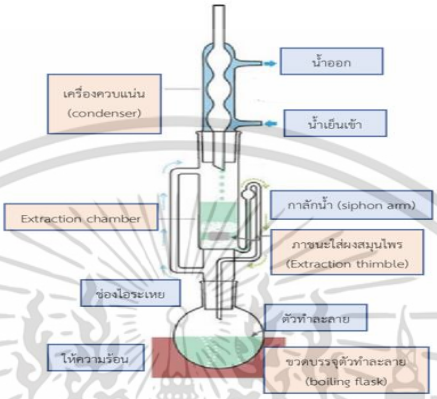
3. เฮกเซน (Hexane) เหมาะสำหรับพวกสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันในสมุนไพร ข้อดีคือมีราคาถูก

4. แอลกอฮอล์ (Alcohol) ที่ใช้มากคือ เมทานอล และเอทานอลเป็น all-purpose solvent เนื่องจากมี คุณสมบัติในการละลายได้กว้างทั้งสารที่มีขั้ว และไม่มีขั้ว และยังใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 สกัดสารด้วยวิธีซอกห์เลต (Soxhlet extraction) (ศิริวัลย์, 2564)

เป็นการสกัดแบบต่อเนื่องที่สกัดสารสำคัญจากสมุนไพรโดยการใช้ความร้อน และตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับแยกสารอินทรีย์ที่ไม่เสถียรที่ความร้อนสูงออกจากสารผสมที่เป็นของแข็ง เครื่องมือที่ใช้เป็นระบบปิดเรียกว่า เครื่องสกัดซอกห์เลต (Soxhlet extractor) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 ลักษณะการสกัดแบบใช้เครื่องสกัดสกัดสารด้วยซอกห์เลต (Soxhlet extractor)

2.5.3 หลักการ : เมื่อนำตัวทำละลายลงในขวดบรรจุตัวทำสารละลาย (boiling flask) และให้ความร้อนเพื่อให้ตัวทำ ละลายระเหยกลายเป็นไอไปตามช่องสำหรับไอระเหย เพื่อให้ไอของตัวทำละลายระเหยขึ้นสู่ส่วนบนที่ต่อกับส่วนควบแน่น (condenser) จากนั้นไอของตัวทำละลายจะถูกควบแน่นตกลงมาสู่ภาชนะที่บรรจุสมุนไพรไว้ (Extraction thimble) เมื่อเวลาผ่านไปตัวทำละลายใน extraction thimble จะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับกาลักน้ำ (Siphon arm) ตัวทำละลายนั้นจะไหลกลับสู่ขวดบรรจุตัวทำละลายด้านล่างแล้วกลั่นตัวขึ้นไปใหม่จนสกัดได้หมด โดยสามารถสังเกตจากสีของตัว ทำละลายใน thimble ที่ใสขึ้น

2.5.4 ตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด

1. ชนิดของตัวทำละลาย : ตัวทำละลายที่ใช้ต้องเลือกให้เหมาะกับสารที่เราต้องการสกัดออก

2. ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัด : ปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ต้องมีมากเพียงพอต่อการเกิดการระเหยขึ้นไป สกัดสารก่อนที่จะเต็มกาลักน้ำ และมีตัวทำละลายเหลืออยู่ในส่วนของขวดบรรจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเพื่อทำให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาทั้งนี้ตัวทำละลายที่มากเกินพอสามารถระเหยออกได้ภายหลังจากเสร็จสิ้นการสกัดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)

3. เวลาที่ใช้สกัด : เวลาที่ใช้สกัดต้องมีความเหมาะสม เพื่อที่จะสามารถสกัดเอาสารที่สนใจออกจากตัวอย่างให้ได้มากที่สุด ส่วนใหญ่เวลาที่ใช้สกัดมักยาวนานหลายชั่วโมง

4. ขนาดของตัวอย่าง : ขนาดของสมุนไพรมีความสำคัญต่อการสกัดด้วยเทคนิคนี้ โดยถ้าตัวอย่างมีขนาดสม่ำเสมอจะทำให้การสกัดเกิดประสิทธิภาพได้ดีเนื่องจากตัวทำละลายสามารถผ่านได้อย่างทั่วถึง ทั้งนี้ขนาดตัวอย่างไม่ควรจะละเอียดหรือหยาบมากเกินไปเพราะถ้าหากเป็นผงละเอียดมากอาจเกิดการอัดแน่น หรือถ้าตัวอย่างหยาบมากเกินไปอาจทำให้การสกัดล่าช้า

ข้อดี : ประหยัดตัวทำละลายเนื่องจากเป็นการสกัดแบบต่อเนื่องได้สารสกัดความเข้มข้นสูง และสมุนไพรจะไม่ถูกความร้อนสูงเท่ากับการให้ความร้อนโดยตรง

ข้อเสีย : การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนจึงอาจทำให้สารสำคัญบางชนิดสลายตัวได้ นอกจากนี้ยังใช้เวลานาน และหลังจากกระบวนการเสร็จสมบูรณ์มีตัวทำละลายอินทรีย์เหลือเป็น waste

2.5.5 สกัดสารด้วย Reflux extraction (จุลินต์ตา, 2565)

การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (Reflux extraction) ใช้ในการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพรที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์, เฮกเซน หรือน้ำ โดยสมุนไพรที่แช่ด้วยแอลกอฮอล์, เฮกเซน หรือน้ำ จะถูกต้มให้ความร้อน เพื่อทำการละลายสารสำคัญออกจากสมุนไพรโดยที่แอลกอฮอล์ หรือน้ำจะถูกต้มจนเดือดระเหยขึ้นไปด้านบน แล้วจะถูกควบแน่นด้วยคอนเดนเซอร์กลับลงมาทำละลายต่อเนื่องหมุนเวียนอย่างนี้ไปเรื่อย ๆ จนสารสกัดละลายเข้มข้น จึงนำไปเข้าเครื่องระเหยแอลกอฮอล์ หรือเครื่องระเหยน้ำเพื่อทำให้เข้มข้นต่อไป ดังรูป 2.8

Reflux ring คือช่วงรอยต่อระหว่างช่วงที่ไอระเหยของสารยังไม่ควบแน่น และช่วงที่ไอระเหยควบแน่นเป็นของเหลว สังเกตได้คือเป็นจุดรอยต่อระหว่างทั้งส่วนแห้ง และส่วนเปียกในคอนเดนเซอร์ อุณหภูมิที่ควรใช้ในการรีฟลักซ์จะต้องอยู่ในช่วงที่ทำให้ Reflux ring อยู่สูงขึ้นไปที่ประมาณ 1 ใน 3 ของคอนเดนเซอร์ เพื่อป้องกันไม่ให้ไอระเหยของสารแพร่ขึ้นไปคอนเดนเซอร์สูงเกินไป และรั่วไหลออกทางปลายด้านบนของคอนเดนเซอร์ ถ้าบรรจุสารที่ทำปฏิกิริยาในขวดก้นกลมจะต้องใส่ Boiling chip ลงไปในสารละลายด้วยเพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงอุปกรณ์ให้ความร้อนที่เหมาะสม ได้แก่ เตาให้ความร้อนแบบหลุมที่สามารถกวนด้วยแม่เหล็กได้ (Heating mantle and magnetic stirrer) หรืออาจเป็นอ่างน้ำร้อนที่วางบนเตาให้ความร้อนแบบกวนด้วยแม่เหล็ก (Hotplate and

เอกสารนี้ [illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Magnetic stirrer) ซึ่งจะทำได้ทั้งให้ความร้อนและกวนได้ต่อเนื่องในเวลาเดียวกันส่วนที่คอนเดนเซอร์จะต่อน้ำเข้า – ออก เพื่อหล่อให้คอนเดนเซอร์เย็นอยู่ตลอดเวลา เมื่อไอของสารที่ทำปฏิกิริยาระเหยเข้าสู่คอนเดนเซอร์จะถ่ายเทความร้อนให้กับผนังคอนเดนเซอร์ที่เย็นจึงควบแน่นกลับเป็นของเหลวไหลลงสู่ขวดก้นกลมอีกครั้งเมื่อถึงจุดเดือดจะเกิดฟองแก๊สเกิดขึ้นในตัวทำละลาย และเมื่อให้ความร้อนเพิ่มขึ้นอุณหภูมิของสารจะไม่เปลี่ยนแปลงแต่อัตราการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นแก๊สเพิ่มขึ้น เนื่องจากของเหลวได้รับพลังงานความร้อนเพื่อนำไปใช้ในการเปลี่ยนสถานะกลายเป็นไอ จุดเดือดของสารผสมจะอยู่ที่จุดใด (อุณหภูมิใด) ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนโมลของสารที่นำมาผสมกัน ของเหลวผสมที่รวมเป็นเนื้อเดียวกันจะเดือดที่อุณหภูมิระหว่างอุณหภูมิที่จุดเดือดของของเหลวผสมแต่ละชนิด เมื่อต้องการแยกสารผสมสามารถแยกออกได้โดยวิธีการกลั่นซึ่งอาศัยหลักความแตกต่างของจุดเดือดของสารในการทดลองที่สลับซับซ้อน การรีฟลักซ์ และการกลั่นสามารถทำได้ในเวลาเดียวกัน เช่น ในขณะที่สารทำปฏิกิริยาในการรีฟลักซ์ อาจเพิ่มอุปกรณ์พิเศษขนาดเล็กสำหรับการกลั่นเข้าไปด้วย การกลั่นจะช่วยลดโอกาสการสูญเสียสารในระบบได้

2.5.6 ขั้นตอนการทำรีฟลักซ์

1. บรรจุสารตั้งต้นที่จะทำปฏิกิริยาหรือสารชนิดแรกลงในขวดก้นกลม ขนาดของขวดก้นกลมควรเหมาะสำหรับบรรจุสารทั้งสองชนิดได้ โดยปริมาตรรวมของสารผสมไม่เกินครึ่งขวด

2. เลือกตัวทำละลายที่ใช้ละลายตั้งต้น คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ใช้ควรเป็นดังนี้

2.1 สามารถละลายสารตั้งต้นได้ที่อุณหภูมิจุดเดือด

2.2 ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น

2.3 เดือดที่อุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วพอสมควร

3. ละลายสารตั้งต้นในตัวทำละลายที่เลือก หรือละลายในสารที่ต้องทำปฏิกิริยาด้วยสารตั้งต้นชนิดที่สอง

4. วางขวดก้นกลมในเตาให้ความร้อนแบบหลุม เติม boiling chip ลงไป 2-3 ชิ้น

5. ใช้ที่หนีบ (clamp) จับที่คอขวดให้มั่นคง จากนั้นต่อคอนเดนเซอร์กับคอขวดก้นหลุม แล้วต่อสายยางน้ำเข้า-ออก (ทางน้ำเข้าอยู่ด้านล่าง ทางน้ำออกอยู่ด้านบน)

6. ให้ความร้อนแก่ระบบให้จุดที่สารเริ่มควบแน่น (reflux ring) อยู่สูงขึ้นไปที่ประมาณ 1 ใน 3 ของคอนเดนเซอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เมื่อสังเกตเห็น reflux ring แล้วจึงปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปตามระยะเวลาที่ต้องการ หากต้องการรีฟลักซ์ข้ามคืน ต้องมัดปลายสายยางที่ต่อกับคอนเดนเซอร์ไว้ ไม่ให้สายยางหลุดขณะที่ผู้ทดลองไม่อยู่

8. เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ให้ปิดเครื่องให้ความร้อน และนำสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป หากไม่ต้องการให้ความชื้นในอากาศเข้าไปรบกวนในปฏิกิริยาให้สวมหลอดดูดความชื้น (Drying tube) ที่บรรจุสารดูดความชื้น ไว้ที่ปลายด้านบนของคอนเดนเซอร์

รูปที่ 2.8 การสกัดด้วยวิธี Reflux extraction

2.6 Column Chromatography

คอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่สามารถใช้แยกสารได้ทั้งแบบปริมาณน้อย ๆ และปริมาณมาก ๆ นั่นจะอาศัยองค์ประกอบสองอย่าง ได้แก่ เฟสคงที่ (stationary phase) และ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ ซึ่งมีสารตัวอย่างที่ต้องการแยกบรรจุ สารตัวอย่างจะถูกดูดซับไว้ในเฟสคงที่ สารใดในสารตัวอย่างที่มีสภาวะขั้วเหมือนกับเฟสเคลื่อนที่ สารนั้นจะเคลื่อนที่ไปกับเฟสเคลื่อนที่ สารที่มีสภาวะขั้วใกล้เคียงกับเฟสเคลื่อนที่ก็จะเคลื่อนที่ต่อมา ส่วนสารใดที่มีสภาวะขั้วแตกต่างกับเฟสเคลื่อนที่มาก ๆ ก็จะไม่เคลื่อนที่ไปกับเฟสเคลื่อนที่ และยังคงถูกดูดซับไว้ที่เฟสคงที่ หากต้องการให้สารตัวอย่างที่ไม่ถูกแยกออกมาด้วยเฟสเคลื่อนที่ชนิดแรก จะต้องใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วใกล้เคียงกับสารชนิดนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 คอลัมน์ Liquid chromatography (Fernanda et al., 2023)

สารที่ต้องการแยกผ่านเข้าคอลัมน์เพื่อเกิดการแยกโดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลว Liquid Chromatography ที่ใช้ในการวิเคราะห์ในปัจจุบัน มีดังนี้

1. Classical LC หรือ Column LC: ใช้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ (โดยทั่วไปประมาณ 100-250 mm) บรรจุในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5 เซนติเมตร

2. High Performance (Liquid Chromatography, HPLC): ใช้อนุภาคที่มีขนาดเล็ก (โดยทั่วไปประมาณ 5-50 mm) บรรจุในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5 มิลลิเมตร ใช้ high pressure pump ในการช่วยให้เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ชนิดลิควิดโครมาโทรกราฟี

2.6.2 เทคนิคของลิควิดโครมาโทกราฟี

โดยแบ่งตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่วิเคราะห์กับคอลัมน์ ได้แก่

2.6.2.1 โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption chromatography)

(ชัยวัฒน์, 2564)$_a$

โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) แยกสารโดยอาศัยหลักการแทนของสารที่จุดดูดซับอยู่บนผิวตัวดูดซับ โดยโมบายเฟสที่เป็นตัวชะ หรือสารตัวอย่างที่ต้องการแยก แต่ละชนิดมีความสามารถในการจับกับตัวดูดซับที่แตกต่างกัน เรียกว่า สัมพรรคภาพ (affinity) จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้ โดยสารที่ถูกดูดซับด้วยแรงยึดเหนี่ยวต่ำกว่าจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีแรงยึดเหนี่ยวสูงกว่าตัวดูดซับ

1. เฟสคงที่ (stationary phase) : ของแข็ง คือตัวดูดซับซึ่งมีความสามารถในการดูดซับสารแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน

2. เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) : ของเหลว เป็นระบบตัวชะ ซึ่งประกอบด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว หรือ 2-3 ชนิดผสมกันทำให้เกิดสภาวะมีขั้ว (polarity) ที่จะไปชะสารที่ต้องการแยกให้หลุดออกจากตัวดูดซับ

การแยกสารให้ได้ประสิทธิภาพที่ดี และให้ผลคงที่ต้องควบคุมความชื้นให้คงที่และปราศจากสารปนเปื้อนตัวดูดซับเป็นสารที่มีความสามารถในการดูดซับสารไว้ที่พื้นผิวด้วยแรงชนิดต่าง ๆ เช่น แรงแวนเดอร์วาลล์ พันธะไฮโดรเจน ตัวดูดซับที่ดีต้องมีสมบัติไม่ถูกละลายโดยตัวทำละลาย และไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยกหรือตัวชะ โดยไม่ทำให้สารที่ต้องการแยกเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างชนิดตัวดูดซับแสดงใน (ตารางที่ 2.1) การเลือกตัวดูดซับให้เหมาะสมกับการแยกสารต้องพิจารณาปัจจัยในเรื่องขนาดของเม็ดตัวดูดซับกัมมันตภาพ (activity) และสภาวะมีขั้วของสารที่ต้องการแยกเนื่องจากการดูดซับเกิดขึ้นที่บนผิว ดังนั้นตัวดูดซับจึงต้องมีขนาดเล็กเพื่อให้มีพื้นที่มากที่สุด ซึ่งขนาดของเม็ดดูดซับมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร หรือเป็น mesh ควรเลือกตัวดูดซับที่มีความละเอียดพอควรเพราะทำให้เกิดสมดุลระหว่างตัวดูดซับกับตัวชะได้ดี ส่งผลให้แยกสารได้ชัดเจน นอกจากนี้ขนาดเม็ดยังมีผลต่ออัตราไหล และความสม่ำเสมอในคอลัมน์ โดยขนาดเม็ดที่ละเอียดจนเป็นผงจะทำให้ตัวชะไหลช้า แต่ถ้าขนาดเม็ดหยาบจนเกินไปจะทำให้การบรรจุในคอลัมน์ไม่สม่ำเสมอ และแรงแวนเดอร์วาลล์เกิดขึ้นจากการเกิดขั้วคู่ (dipole) ชั่วขณะหนึ่งของโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งมีผลเหนี่ยวนำให้อีกโมเลกุลหนึ่งที่อยู่ใกล้เคียงเกิดขั้วคู่ด้วยเป็นผลทำให้ทั้งสองโมเลกุลสามารถดึงดูดซึ่งกันและกันด้วยแรงไฟฟ้าสถิตย์

ตารางที่ 2.1 ตัวดูดซับที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ทิศทางการลดลงของกัมมันตภาพ		
	อะลูมินา (alumina)	ตัวดูดซับอย่างแรง
	ถ่าน (charcoal)	
	ซิลิกาเจล (silica gel)	
	แมกนีเซีย (magnesia)	ตัวดูดซับปานกลาง
	แมกนีเซียม คาร์บอเนต (magnesium carbonate)	
	แคลเซียมฟอสเฟต (calciam phosphate)	
	แคลเซียมคาร์บอเนต (calciam carbonate)	
	อินูลิน (inulin)	ตัวดูดซับอย่างอ่อน
	แป้ง (starch)	
	ซูโครส (sucrose)	
	เซลลูโลส (celllulose)	

3. ตัวดูดซับที่ดีต้องมีคุณสมบัติ

1. ไม่ถูกละลายโดยตัวทำละลาย
2. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยกหรือตัวชะ
3. ไม่ทำสารที่ต้องการแยกเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเลือกใช้ตัวดูดซับชนิดใดต้องพิจารณาควบคู่ไปกับสารที่ต้องการแยก

1. สารที่ต้องการแยกมีสภาพมีขั้วอ่อน ๆ ควรใช้ตัวดูดซับที่มีกัมมันภาพสูงมิฉะนั้นจะถูกชะออกอย่างรวดเร็วจนอาจไม่เห็นการแยก

2. สารที่ต้องการแยกมีสภาพมีขั้วสูง ตัวดูดซับที่ใช้ก็ควรมีกัมมันตภาพต่ำตัวชะ (ตารางที่ 2.2) ที่ใช้มักใช้ตัวโมบายเฟสมาผสมกัน 2-3 ชนิด ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้โมบายเฟสชนิดเดียว การผสมกันของตัวโมบายเฟสในอัตราส่วนต่าง ๆ สร้างสภาพมีขั้วให้แก่ตัวชะแตกต่างกันออกไป

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของโมบายเฟส

นอร์มอลเฮกเซน (n-hexane)	ต่ำ
ไซโคลเฮกเซน(cyclohexane)	
คาร์บอนเตตราคลอไรด์ (carbon tetrachloride)	
โทลูอีน (toluene)	
เบนซีน (benzene)	
เมทธิลีนคลอไรด์ (methylene chloride)	
นอร์มอลโพรพานอล (n-propanol)	
เอธิลแอซีเตต (cthyi acetate)	
ไอโซโพรพานอล (iso-propanol)	
คลอโรฟอร์ม (chloroform)	
อะซีโทน (acetone)	
เอธานอล (ethanol)	
อะซีโทไนไตร (acetonitrile)	
เมธานอล (methanol)	
นำ (water)	สูง

2.6.2.2 โครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน (Partition chromatography)

(ชัยวัฒน์, 2564)$_b$

โครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน (partition chromatography) เป็นระบบการแยกสารที่มีเฟสคงที่เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนตัวยึดที่เป็นของแข็ง เฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวเช่นกันแต่เป็นโมบายเฟสที่ผสมได้เพียงบางส่วนกับโมบายเฟสในเฟสคงที่ โดยซิลิกาเจล, ดีเซลกัวร์ (kieselguhr) หรือผงเซลลูโลส มักใช้เป็นตัวยึดกับเฟสคงที่ โมบายเฟสที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มักมีสภาพมีขั้วสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคนี้เรียกว่า โครมาโทกราฟีแบบเฟสปกติ (normal phase chromatography) ถ้ากรณีที่เฟสคงที่เป็นโมบายเฟสที่มีสภาพมีขั้วต่ำกว่าในเฟสเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการแยกสารประเภทไม่มีขั้ว เทคนิคนี้เรียกว่า โครมาโทกราฟีแบบย้อนกลับ (reverse phase chromatography) ซึ่งต้องเคลือบผิวด้วยสารจำพวกไม่ชอบน้ำ หรือที่มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนเชื่อมติดอยู่ เช่น ซิลิกาเจลที่มีคาร์บอน เชื่อมติดอยู่ การเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับความเข้มข้นสัมพันธ์ในเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ ตัวถูกละลายจะเคลื่อนที่กลับไปกลับมาระหว่างเฟสทั้งสองอัตราการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับความสามารถใน การละลายของสารในทั้งสองเฟสนั้น ซึ่งสามารถแสดงเป็นค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (partition coefficient หรือค่า k คือ ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่หารด้วย ความเข้มข้นของสารเฟสคงที่ เมื่อถึงสมดุลแล้ว ค่า k นี้มีค่าคงที่ตามอุณหภูมิที่กำหนด

ดังนั้นสารที่มีความสามารถละลายในเฟสคงที่ได้ดีกว่า จะเคลื่อนตัวไปได้ช้ากว่าสารที่มีความสามารถละลายในเฟสเคลื่อนที่ดี การเปลี่ยนส่วนผสมของชนิดโมบายเฟสมีผลเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของตัวถูกละลายในเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่สารบางชนิดสามารถอยู่ในรูปของไอออนได้หลายรูป เช่นกรดอะมิโนสามารถอยู่ในรูปแคตไอออน แอนไอออน ไอออนขั้วคู่ (zwitterion) หรือไอออนขั้วคู่รวมกับไอออนชนิดใดชนิดหนึ่งอีกชนิด การแยกให้ได้ผลดีควรมีการควบคุมรูปไอออนให้อยู่ในรูปใดรูปหนึ่ง ซึ่งทำได้หลายทาง เช่น เติมกรดหรือด่างลงในสารตัวอย่าง หรือเติมบัฟเฟอร์ลงในเฟสคงที่

2.6.2.3 โครมาโทกราฟีแบบการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-Exchange Chromatography) (Mansoor., 2005)$_A$

โครมาโทกราฟีแบบการแลกเปลี่ยนไอออนคือ เป็นการแยกสารโดยอาศัยประจุของโมเลกุลสาร โดยใช้เฟสคงที่ บรรจุในคอลัมน์เป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนไอออน สารที่ปล่อยออกมาจะขึ้นอยู่กับสภาวะของไอออนที่อยู่ในระบบ สารที่ต้องการแยกจะยึดติดกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนด้วยประจุตรงข้ามกัน จะต้องใช้โมบายเฟสเป็นตัวชะเพื่อให้สารแยกออกจากกันได้ดี ในการเลือกโมบายเฟสนั้นต้องคำนึงถึงตัวอย่างที่ต้องการแยก ควรเลือกใช้โมบายเฟสที่เข้ากันได้ดีกับตัวอย่างสารที่ต้องการแยก จะสามารถทำให้แยกสารที่ต้องการได้ในปริมาณที่เยอะและบริสุทธิ์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.4 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (Gel filtration) หรือ (Size-exclusion Chromatography) (Mansoor., 2005)$_B$

โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน เป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีที่อาศัยการแยกสาร โดยการใช้ประโยชน์ของการแยกสารโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลในเฟสคงที่ เป็นการนำเจลที่เป็นสารพอลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายน้ำดูดซับโมบายเฟสได้ดี โดยภายในเจลจะมีรูพรุน ขนาดเล็ก ถ้าสารที่ต้องการ แยกมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนขอเจล สารนั้นก็จะสามารถแยกได้ภายในเวลารวดเร็ว ส่วนสารที่ต้องการแยกถ้ามีขนาดที่ใหญ่กว่ารูพรุนของเจล ก็จะต้องใช้เวลาในการแยกที่นานกว่า เนื่องจากขนาดของรูพรุมในเจลมีหลากหลายควรเลือกเจลให้มีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก ในวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตรชันนิยมแยกสารชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น โปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิค เป็นต้น

2.6.2.5. โครมาโทกราฟีแบบแฟลชคอลัมน์ (Flash column chromatography) (Price et al., 1987)

โครมาโทกราฟีแบบแฟลชคอลัมน์ เป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบพิเศษที่ใช้แรงดัน (เช่น ไนโตรเจน หรืออากาศ) หรือปั๊มเพื่อดันโมบายเฟสผ่านคอลัมน์ โดยเฉพาะเทคนิคนี้ มีประโยชน์ช่วยให้อัตราการไหลของโมบายเฟสเร็วขึ้นกว่าการไหลตามแรงโน้มถ่วง โดยโครมาโทกราฟีแบบแฟลชคอลัมน์นิยมใช้เฟสคงที่ เป็น ซิลิกาเจล ซึ่งมีขนาดอนุภาคที่ละเอียด

โครมาโทกราฟีแฟลชคอลัมน์ (Flash column chromatography) มีข้อดีกว่าโครมาโทกราฟีแบบทั่วไป เนื่องจากแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้โมบายเฟสซึมผ่านคอลัมน์ได้เร็วกว่าโครมาโทกราฟีแบบทั่วไปที่มีอัตราการไหลช้า ด้วยการใช้แรงดันอากาศ ซึ่งช่วยในการเคลื่อนย้ายโมบายเฟสผ่านคอลัมน์ด้วยความเร็วที่สูงขึ้น สามารถช่วยลดเวลาในการแยกสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งใช้เวลาเพียง 10-15 นาที ในการแยกสาร นอกจากใช้เวลาที่น้อยลงแล้ว โครมาโทกราฟีแฟลชคอลัมน์ยังมีข้อดีอื่น ๆ คือไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง และมีขั้นตอนการบรรจุที่ง่าย

2.6.2.6. เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin-layer chromatography, TLC)

เทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) สามารถใช้วิเคราะห์สารได้หลากหลายชนิดโดยการวิเคราะห์ด้วย TLC ต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ออกมาถูกต้องแม่นยำมากที่สุดซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำและมีความไวสูง อีกทั้งมีราคาที่ถูกกว่าการวิเคราะห์ด้วย HPLC นอกจากนี้ได้มีการนำ TLC มาวิเคราะห์สารปนเปื้อนต่าง ๆ ในอาหารอย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานการนำเทคนิค TLC มาใช้ในการวิเคราะห์สารอาหารในอาหารไทย ซึ่งประกอบไปด้วยสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาและสารอาหารที่เป็นประโยชน์จำนวนมาก ดังนั้น หลักการของ TLC คือเฟสคงที่จะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก, แผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก บางๆ สารจะถูกจุดไว้ที่ใกล้ ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอด capillary Tube จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าว ไปวางลงในภาชนะที่ใส่เฟสเคลื่อนที่ไว้ตื้น ๆ เมื่อโมบายเฟสถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้น ตัวอย่างเช่น หากใช้

ซิลิกาเป็นเฟสคงที่ และใช้โมบายเฟสที่มีขั้วต่ำเป็นเฟสเคลื่อนที่สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในเฟสเคลื่อนที่ จึงสามารถเคลื่อนที่ขึ้นไปพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่ ส่วนสารที่มีขั้วมากจะถูกดูดซับไว้ที่เฟสคงที่หรือซิลิกาจึงไม่เคลื่อนที่ หรือเคลื่อนที่ได้น้อยจึงเกิดการแยกขึ้นในระบบ (ยุทธนา และคณะ, 2566)

1) การเลือกใช้โมบายเฟสสำหรับเทคนิค TLC (solvent system)

ประสิทธิภาพในการแยกสารที่เหมาะสม จะขึ้นอยู่กับการเลือกใช้โมบายเฟสที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากสารผสมที่อยู่ในสารตัวอย่างมีสภาพขั้วที่แตกต่างกันหากเป็นสารที่มีขั้วมากก็จะถูกดูดซับไว้ที่ซิลิกาเจลได้ดี จึงไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ได้น้อยส่วนสารที่มีสภาพขั้วต่ำซึ่งละลายได้ดีในโมบายเฟสที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะเคลื่อนที่ไปกับเฟสเคลื่อนที่ได้ดี จึงทำให้เกิดการแยกในระบบโมบายเฟสที่เหมาะสม สามารถนำสารผสมในตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากจุดที่แต้มสารได้ทุกสาร ช่วงค่า Rf ที่ถือว่าเป็นโมบายเฟสที่ดีควรเคลื่อนที่สารให้มีช่วงค่า Rf ตั้งแต่ 0.15 – 0.85 (ตาม ทฤษฎีควรเป็น 0.2-0.4) โมบายเฟสที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นโมบายเฟสเดี่ยวหรือเป็นโมบายเฟสผสมก็ได้ การเลือกโมบายเฟสที่เหมาะสมมีขั้นตอนในการเลือกดังนี้ เนื่องจากปกติแผ่น TLC จะมีเฟสคงที่เป็นซิลิกาเจล (silica gel) ซึ่งมีขั้วสูง โมบายเฟสที่จะเลือกจะมีสภาพขั้วต่ำกว่า ดังนั้นจึงควรเลือก โมบายเฟสที่มีขั้วต่างกันมาหลาย ๆ ชนิด เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน อีเทอร์ และเมทานอล เรียงลำดับ ตามจากสภาพขั้วต่ำไปยังสภาพขั้วสูง การใช้กรดคาร์บอกซิลิก เช่น กรดอะซิติกก็สามารถใช้ได้แต่จะใช้ใน อัตราส่วนที่ต่ำเพราะกรดมีฤทธิ์กัดกร่อนและมีขั้วสูงมากเมทิลีนคลอไรด์และคลอโรฟอร์มเป็นโมบายเฟสที่ดีแต่มีความเป็นพิษจึงควรใช้เท่าที่จำเป็นเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเรียงลำดับความมีขั้วของโมบายเฟสอินทรีย์แล้วให้วางแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนแผ่น TLC แล้ววางลงในโมบายเฟสแต่ละชนิด ๆ ละแผ่น หาค่า Rf ของแต่ละแผ่นที่วางในโมบายเฟสแต่ละชนิด แล้วจึงเลือกโมบายเฟสที่สามารถแยกสารได้ดีที่สุด หากโมบายเฟสเดี่ยวไม่สามารถแยกสารได้ชัดเจน จะต้องเลือกใช้โมบายเฟสผสม โดยการผสมโมบายเฟสไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน กับโมบายเฟสมีขั้วเช่น เอทิล อะซิเตต (Ethyl Acetate) หรือ อะวิโตน (Acetone) ในอัตราส่วนต่าง ๆ แล้วเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด (ยุทธนา และคณะ, 2566)

2.6.2.7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (วีรวรรณ, 2538)

High Performance Liquid Chromatography เป็นเทคนิคหนึ่งของลิควิดโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดเล็กสามารถแยกได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเนื่องจากมีการใช้ความดันช่วยซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ โดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหย และไม่คงตัวต่อความร้อน

1. หลักการของ HPLC

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบของเหลวหรือโมบายเฟสซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ซึ่ง สารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่ หรือ เฟสคงที่ สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันหรือละลายได้ดีกับ เฟสเคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อนส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ เฟสเคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับ เฟสคงที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณที่ตรวจวัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทรแกรม (chromatogram) ประกอบด้วย พีค (peaks) ของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Normal phase

เฟสคงที่จะมี polarity สูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารที่มีขั้วมากจะถูกหน่วงเหนี่ยวให้อยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าสารที่มีขั้วน้อย ทำให้สารที่มีขั้วน้อยออกจากคอลัมน์เร็วกว่าสารที่มีขั้วมาก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้ดีในไขมัน เช่น สารประกอบประเภท polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่มีปะปนทั่วไปในอากาศ และน้ำเสีย

3. Reverse phase

จะตรงกันข้ามกับ normal phase เฟสคงที่จะมี polarity ต่ำกว่าเฟสเคลื่อนที่ สารที่ มีขั้วมากจะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารที่มีขั้วน้อย โครมาโทกราฟีประเภทนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางมาก เหมาะสำหรับการแยกสารประกอบที่ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในโมบายเฟสอื่นที่เข้ากับน้ำหรือละลายในน้ำได้เป็นต้นว่า เมทานอล หรือ อะซิโตไนไตรล์

4. Detector

เป็นส่วนที่สำคัญมากอีกส่วนหนึ่งของเครื่อง HPLC เพื่อตรวจวัดสารโดยวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด แต่ชนิดที่มีการใช้กันมากมีอยู่ 3 ชนิดดังนี้

4.1. Ultraviolet visible detector (UV-VIS detector) เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะสารมากกว่า 90% ดูดกลืนแสงได้ เครื่องวัดแบบเก่าจะเป็นแบบ fixed wavelength วัดได้ที่ความยาวคลื่นเดียว ปัจจุบันนิยมใช้แบบ variable UV-VIS detector สามารถเปลี่ยนความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร เครื่องวัดแบบใหม่จะเป็นแบบ photodiode array โดยที่ระบบทางเดินแสงจะเป็นแบบย้อนแสง (reverse optic) สามารถสแกน UV-VIS spectrum ได้รวดเร็วมากและในการวิเคราะห์สามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็นสามมิติได้ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพ ความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์

4.2. Refractive index detector (RI เป็นเครื่องตรวจวัดความแตกต่างของ detector) ดัชนีหักเหของตัวถูกทำละลาย หรือสารที่ต้องการวิเคราะห์กับเฟสเคลื่อนที่เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจวัดต่ำกว่า UV-VIS detector มาก แต่เป็นเครื่องที่ใช้ตรวจวัดสารที่ถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้เกือบทุกชนิด ปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องมีมากพอสมควร จึงไม่เหมาะกับการตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อย เครื่องตรวจวัดจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. Fluorescence detector เป็นเครื่องตรวจวัดที่มีความไวสูงกว่าเครื่อง UV และ RI มาก ถึง 1,000 เท่า ใช้กับสารประกอบที่เรืองแสงได้เอง หรือทำให้มันเรืองแสงโดยวิธี derivatization ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์กับสารที่เรืองแสงได้ก่อนการวัดด้วย fluorescence detector

2.6.3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เจนจิรา และคณะ, 2557 ศึกษาผลของการทดลองของฮอร์โมน NAA ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร, 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4000 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับฮอร์โมน IBA ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร, 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4000 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเกิดรากของหม่อนโดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยจะทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่า IBA ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดรากมากที่สุด

อัจฉรา และคณะ, 2020 นำรากหม่อนที่ใช้ในการวิจัย คือ *Morus alba L.* นำรากหม่อนอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บดเป็นผงละเอียดจำนวน 3200 กรัมแห้ง มาสกัดแบบต่อเนื่องด้วยวิธี Soxhlet extraction ด้วยโมบายเฟสที่มีขั้วต่างกันคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ โดยใช้ปริมาตรตัวละลายแต่ละชนิดเท่ากับ 4 ลิตร ระเหยแยกโมบายเฟสออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) นำมาตรวจสอบด้วยวิธี TLC ด้วยระบบโมบายเฟสแบบที่ 1 เฮกเซน : ไดคลอโรมีเทน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.3) และแบบที่ 2 คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ : กรดอะซิติก (52 : 28 : 15 :15) เป็นระบบโมบายเฟสที่มีขั้วสูง สำหรับการสกัดเมทานอล ทำการสังเกตและบันทึกผลภายใต้แสงปกติ และ UV366 นาโนเมตร จากการทดลองของสารสกัดไดคลอโรมีเทน ต้องทำการแยกสารที่ละลายได้ในเฮกเซนออกไปจะสามารถให้การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้สูงถึงร้อยละ 86.7 ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอลต้องนำมาแยกเอาเฉพาะส่วนที่ละลายได้ใน ไดคลอโรมีเทนจะให้การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้สูงถึงร้อยละ 95 และเนื่องจากปริมาณของสารสกัดเมทานอลจากรากหม่อนมีปริมาณสูงสุดคือร้อยละ 11.52

Xu et al., 2020 ศึกษาสารต้านการอักเสบ และสารต้านอนุมูลอิสระจากผลของ Mulberry (*Morus alba L.*) โดยนำผลหม่อนแห้ง 20 กิโลกรัม สกัดด้วยเอทานอล 70% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และถูกกรองแล้วนำไปแยกส่วนด้วยเฮกเซน(hexane), คลอโรฟอร์ม (chloroform) ด้วยวิธีโครมาโทกราฟฟี แล้วสุดท้ายนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLCและนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย MTT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อวัดความเป็นพิษต่อเซลล์, การวัดปริมาณการผลิตไนตริก- ออกไซด์ (NO) มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการอักเสบ, วัดการต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบการยับยั้งของ α - glucosidase ในการศึกษาสารประกอบ 70 ชนิด ที่สกัดจากผลของหม่อนที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ในเซลล์ไมโครเกลีย (BV-2) มีการยับยั้ง NO, α - glucosidase ต้านเบาหวาน และยังสามารถต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการบริโภคหม่อนอย่างสมเหตุสมผลอาจช่วยป้องกัน และลดการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของระบบประสาทและต้านอนุมูลอิสระได้

Anis et al., 2003 ศึกษาการเพาะเลี้ยง การชักนำ การงอกใหม่ และการเพิ่มจำนวนของต้นหม่อนโดยศึกษาจากการนำปลายยอด และส่วนปมจากยอดหม่อนล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วย ทีโพล์ (Teepol) 5% เป็นเวลา 8- 10 นาที และน้ำกลั่นหลังจากนั้น นำพืชมาฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ 0.1% เป็นเวลา 5 - 7 นาที นำปลายยอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เสริมด้วย ออกซิน, ไซโตไคนิน และกรดอะมิโนสองตัว (กลูตามีน และแอสปาร์จีน) ผลที่ได้บนอาหาร MS ที่เสริมด้วย BAP และ KN ในหลอดทดลองเกิดยอดที่งอกใหม่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนการเพาะเลี้ยงปลายยอดและการขยายของลำต้นบนอาหารMS ที่เสริมด้วย BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, แอสปาร์จีน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลูตามีน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลที่ได้คือพืชมีการแตกหน่อของตาที่ซอกใบในหลอดทดลองหน่อที่โตแล้วได้รากประมาณ 80% จากหน่อที่เลี้ยงบน MS ที่เสริมด้วย NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พืชมีรากที่เต่งดีถูกย้ายลงดินด้วยอัตราการรอดตายอยู่ที่ 90% เทคนิคที่อธิบายไว้นี้เป็นวิธีการที่มีใช้สำหรับการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วในระดับการค้าของพืชสวน และพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

Katsube et al., 2006 ได้ศึกษาสารสกัดจากใบหม่อนสด (*morus alba L.*) และใบหม่อนแห้ง ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60% พบว่ามีสาระสำคัญที่สามารถต้านอนุมูลอิสระชนิดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซต์ (flavonol glycosides) ที่มีฤทธิ์ต้านไขมันชนิดแอลดีแอลในกระแสเลือดได้ นอกจากใบหม่อนแล้ว ยังมีการศึกษาหม่อนที่มีผลสีขาว, สีแดง และสีดำของหม่อนต่างสายพันธุ์ ผลปรากฏว่าผลสีดำมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ส่วนในผลหม่อนสีขาวพบกรดไขมันจำเป็นแบบไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) และเป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ได้แก่ ลิโนเลอิกในปริมาณที่สูงสุด นอกจากนี้ยังพบธาตุอาหารต่างๆ เช่น ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม แคลเซียม, แมกนีเซียม, โซเดียม, เหล็ก, ทองแดงแมงกานีส และสังกะสี ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าเป็นแหล่งที่สำคัญของสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชที่ใช้

3.1.1 หม่อน (*Morus alba* Linn.*)* จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

3.2 สารเคมีที่ใช้

3. 2.1 0. 1 N HCl (Hydrochloric acid)

3. 2.2 0. 1 N NaCl (Sodium chloride)

3. 2.3 KCl (Potassium chloride)

3.2.4 Tween 20

3.2.5 เมทานอล (Methanol)

3.2.6 เอทิลแอลกอฮอล์ 70%

3.2.7 เอทิลแอลกอฮอล์ 95%

3.2.8 ไฮเตอร์

3.2.9 เฮกเซน

3.2.10 เอทิล อะซิเตท

3.2.11 น้ำตาล (Sucrose)

3.2.12 ผงวุ้น (Agar)

3.2.13 น้ำกลั่น

3.2.14 อาหารสูตร MS (Murashige & Skoog)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 ตัวกรอง 0.2 ไมครอน (Syringe Filter)

3.3.2 กระบอกตวง 100 250 1000 มิลลิลิตร

3.3.3 ขวดเพาะเลี้ยง 4 ออนซ์ (M) 8 ออนซ์ (L)

3.3.4 ขวดโหลแก้ว 24 ออนซ์

3.3.5 มีดผ่าตัด

3.3.7 เครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography)

3.3.8 เครื่องกรองสูญญากาศ (Vacuum Filter)

3.3.9 เครื่องเขย่า (Shaker)

3.3.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.11 เครื่องวัด pH (pH meter)

3.3.12 ไมโครปิเปต ทิป (Micropipette tips)

3.3.13 ตัวกรอง 0.45 ไมครอน (Syring Filter)

3.3.14 คอลัมน์สำเร็จรูป C18

3.3.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.16 ช้อนตวง หรือแท่งแก้ว

3.3.17 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

3.3.18 ไมโครเวฟ (Microwave)

3.3.19 หลอดเซนติฟิวก์ 1 มิลลิลิตร

3.3.20 ถ้วยเขียวปลูกไฮโดรโปนิกส์

3.3.21 บีกเกอร์แก้ว 200, 500, 1000 มิลลิลิตร

3.3.22 บีกเกอร์พลาสติก 250, 500, 3000 มิลลิลิตร

3.3.23 เพลทแก้ว

3.3.24 ไฟแช็ค

3.3.25 ปากคีบสแตนเลส

3.3.26 เครื่องวัดpH (pH meter)

3.3.27 คอลัมน์กระบอกฉีดยา

3.3.28 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.2.29 แผ่น TLC

3.2.30 ซิลิกา เจล

3.2.31 กระบอกสูบเพื่ออัดแรงดันในคอลัมน์

3.4 วิธีดำเนินการ

3.4.1 การศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตร1/4MS ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน

3.4.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง MS เต็มสูตร

ทำการชั่งน้ำหนักอาหารสำเร็จรูปมา 4.43 กรัม ,น้ำตาล 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตรแล้วนำมาปรับ pH ในช่วงที่ 5.6 ถึง 5.8 นำมาใส่วุ้น 8 กรัม ละลายวุ้นกับอาหารให้เข้ากันด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Microwave) จากนั้นใส่ขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อ

เลือกก้านหม่อนที่มีสีเขียวสดที่ไม่อ่อนและไม่แก่จนเกินไป ตัดส่วนใบออกแล้วนำส่วนก้านของหม่อนมาล้างด้วยน้ำประปา ก่อนตัดส่วนข้อของก้านหม่อนเป็นตัววาย (Y) นำมาล้างผ่านน้ำระยะเวลา 15 นาที ย้ายข้อหม่อนใส่ขวดที่มีแอลกอฮอล์ 70% เขย่าเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นย้ายข้อหม่อนลงในไฮเตอร์ 20 % ที่มี tween-20 จำนวน 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนข้อของหม่อนมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4 ครั้ง นำข้อหม่อนออกมาซับน้ำให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วตัดส่วนสีขาวที่เป็นบริเวณที่ตายออก ก่อนจะย้ายลงขวดที่มีอาหารตามวิธี ข้อ 3.4.1.1 นำมาเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง

3.4.1.3 การปรับสภาพต้นหม่อนในระบบไฮโดรโปนิกส์แบบน้ำนิ่ง

ทำการชั่งอาหารสำเร็จรูป MS ให้ได้ความเข้มข้น 1/24MS มา 0.185 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ใส่ลงในขวดโหลขวดละ 150 มิลลิลิตร คัดเลือกต้นหม่อนจากข้อ 3.4.1.2 อายุ 2 เดือน จำนวน 25 ต้น นำออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ล้างวุ้นออกจากรากให้หมด ย้ายลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 1/24 ให้บริเวณโคนรากของต้นหม่อนอยู่ในอาหารเหลว จากนั้นนำถุงพลาสติกใสเจาะรูครอบต้นหม่อนเพื่อลดการคายน้ำ ระยะเวลา 2 สัปดาห์ นำถุงพลาสติกใสที่ครอบต้นหม่อนออก เลี้ยงต่อจนครบ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง

3.4.1.4 การเตรียมอาหารเหลวสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 1/4MS

ทำการชั่งอาหารสำเร็จรูป MS ให้ได้ความเข้มข้น 1/4MS มา 1.1075 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ใส่ลงในขวดโหลขวดละ 500 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงต้นหม่อนในระบบไฮโดรโปนิกส์แบบน้ำนิ่ง

3.4.1.5 การศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตร 1/4MS ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน

นำอาหารจากข้อ 3.4.1.4 มาเพาะเลี้ยงต้นหม่อนที่ถูกปรับสภาพ จำนวน 25 ต้น ในระบบไฮโดรโปนิสก์แบบน้ำนิ่ง ระยะเวลา 7 เดือน โดยในทุก ๆ เดือน จะทำการตัดรากให้เหลือรากโคนต้นยาว 1 เซนติเมตร นำรากที่ตัดมาหาน้ำหนักแห้งและหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อน นำต้นหม่อนที่ถูกตัดรากแล้วมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ที่มีความเข้มข้นเท่าเดิมเพื่อให้เกิด

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รากใหม่ ทำการตัดใบทิ้งเพื่อลดการคายน้ำ จะทำแบบนี้ทุก ๆ เดือน จนครบระยะเวลา 7 เดือน เพื่อหาน้ำหนักแห้งของรากต้นหม่อนและหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในราก

3.4.1.6 การสกัดสารมัลเบอร์โรไซด์เอจากรากของต้นหม่อนด้วยวิธี Soxhlet Extraction

นำรากแห้งของต้นหม่อนหนัก 0.5 กรัม ปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด นำกระดาษกรองห่อรากที่ปั่นละเอียดและ ใส่ลงใน Extraction chamber ของเครื่องสกัด Soxhlet เติม 100% เมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงใน Boiling flask ระยะเวลาสกัด 2 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้อบเพื่อหาน้ำหนักแห้ง

3.4.1.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซเอ ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

เตรียมตัวอย่างสารสกัดรากของต้นหม่อนตามวิธี ข้อ 3.4.1.6 มาละลายด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร (ค่าเจือจาง) มากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำสารสกัดจากรากของต้นหม่อนที่ได้ไปฉีด HPLC

สภาวะของโครมาโทกราฟ (HPLC)

HPLC column	: ROC C18 ขนาด 4.6 x 150 บรรจุอนุภาค 5 ไมโครเมตร
Mobile phase	: 60% Methanol: 0.1% Acetic acid
Flow rate	: 1.0 มิลลิลิตร/นาที
Detector	: UV 320 นาโนเมตร
Pump Pressure	: 2079 PSI
Injection volume	: 20 ไมโครลิตร

การคำนวณปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอจากการฉีดด้วยเครื่อง HPLC

ตัวอย่าง การคำนวนรากแห้งของต้นหม่อน 0.5 กรัมแห้ง ที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet Extraction โดยนำสารสกัดรากหม่อนมาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้ง นำมาละลายด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฉีด HPLC พบว่า มีความเข้มข้นของสารมัลเบอร์โรไซด์เออยู่ 417.15 ppm แต่ต้องการทราบว่า รากแห้ง 1 กรัม มีสารมัลเบอร์โรไซด์เอ กี่มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้ง คำนวณได้ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณ ppm คือ 1ส่วนในล้านส่วน จึงแทนเป็นหน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 417.15 มิลลิกรัม ใน 1000 มิลลิลิตร ถ้าในโมบายเฟสเมทานอล 10 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของสารมัลเบอร์โรไซด์เอกี่กรัม

$$\frac{417.15 \text{ มิลลิกรัม } x \text{ } 10 \text{ มิลลิลิตร}}{1000 \text{ มิลลิลิตร}} = 4.1715 \text{ มิลลิกรัม ใน } 0.5 \text{ กรัมรากแห้ง}$$

และถ้าใน 1 กรัมจะมีสารมัลเบอร์โรไซด์เอ

$$\frac{4.1715 \text{ มิลลิกรัม } x \text{ } 1 \text{กรัม}}{0.5 \text{ กรัมรากแห้ง}} = 8.343 \text{ มิลลิกรัมต่อกรัมรากแห้ง}$$

3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น ¼MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA หรือ IBA ต่อการเจริญของรากและปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน

เตรียมอาหารตามวิธี ข้อ 3.4.1.4 ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ที่มีความเข้มข้น 0.25,1,4 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารตามวิธี ข้อ 3.4.1.4 ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ที่มีความเข้มข้น 0.25, 1, 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในขวดโหล ขวดละ 500 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ นำต้นหม่อนที่ถูกปรับสภาพตามวิธี ข้อ 3.4.1.3 จำนวน 30 ต้น มาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นและวัดความสูงของต้นหม่อน จากนั้นนำต้นหม่อนมาเลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมนในระบบไฮโดรโปนิกส์แบบน้ำนิ่ง ระยะเวลา 1 เดือน หลังจากครบเวลา 1 เดือน ทำการชั่งน้ำหนักสดสุดท้ายและวัดความสูงของต้นหม่อน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของต้นหม่อน จาก Growth index ดังสมการที่ 1 ทำการตัดรากต้นหม่อนจนหมด นำรากที่ตัดมาหาน้ำหนักแห้งและนำรากแห้งของต้นหม่อนมาสกัดด้วยวิธีตามวิธี ข้อ 3.4.1.6 เพื่อหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ตามวิธี ข้อ 3.4.1.7

$$Growth\ index = \frac{\text{น้ำหนักสดสุดท้าย} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}} \quad \text{_____ สมการที่1}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate, Potassium nitrate, Potassium dihydrogen phosphate ต่อการเจริญของรากและสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน

เตรียมอาหารตามวิธี ข้อ 3.4.1.4 ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate ที่มีความเข้มข้น 10,40 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารตามวิธี ข้อ 3.4.1.4 ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium nitrate ที่มีความเข้มข้น 10, 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารตามวิธี ข้อ 3.4.1.4 ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium dihydrogen phosphate ที่มีความเข้มข้น 10, 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในขวดโหล ขวดละ 500 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ นำต้นหม่อนที่ถูกปรับสภาพตามวิธี ข้อ 3.4.1.3 จำนวน 30 ต้น มาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของต้นหม่อน จากนั้นนำต้นหม่อนมาเลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบในระบบไฮโรโปนิกส์แบบน้ำนิ่งระยะเวลา 1 เดือน หลังจากครบ 1 เดือน ทำการชั่งน้ำหนักสดสุดท้าย เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของต้นหม่อนจาก Growth index ดังสมการที่ 1 ทำการตัดรากต้นหม่อนจนหมด นำรากที่ตัดมาหาน้ำหนักแห้งและนำรากแห้งของต้นหม่อนมาสกัดด้วยวิธีข้อ 3.4.1.6 เพื่อหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอตามวิธี ข้อ 3.4.1.7

3.4.4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากของต้นหม่อนด้วยวิธี Column Chromatography

3.4.4.1 การสกัดสารมัลเบอร์โรไซด์เอจากรากของต้นหม่อนด้วยวิธี Reflux Extraction

นำรากแห้งของต้นหม่อน 14 กรัม ปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด นำรากหม่อนที่ปั่นจนละเอียดและมาใส่ใน round bottom flask ของเครื่องสกัด Reflux ที่เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาในการสกัด 12 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้ง

3.4.4.2 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟส เป็น เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol) และน้ำ (Water) ตามลำดับ

นำสารสกัดที่ได้ตามวิธี ข้อ 3.4.4.1 มาละลายด้วย 50%เอทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทำการเตรียมคอลัมน์กระบอกฉีดยาโดยการนำสำลีอุดไว้บริเวณช่วงปลายคอลัมน์กระบอกฉีดยา เติม Silica gel ลงในคอลัมน์กระบอกฉีดยาสูง 30 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 30 มิลลิลิตร ทำการอัดแรงดันอากาศเข้าไปในคอลัมน์กระบอกฉีดยาเพื่อให้เอทานอลไหลออกมา เติมสารสกัดจากรากหม่อนที่

เอกสารนี้ [illegible] การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายไว้แล้วลงในคอลัมน์กระบอกฉีดยาปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเฮกเซน (Hexane) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการอัดแรงดันอากาศเพื่อเก็บตัวอย่างจากนั้นทำซ้ำด้วยวิธีเดิมโดยใช้โมบายเฟส เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol) และน้ำ (Water) ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์กระบอกฉีดยามาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้ง และนำมาละลายด้วย 70%เมทานอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ตามวิธี ข้อ 3.4.1.7

3.4.4.3 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ตามลำดับ

นำสารสกัดที่ได้ตามวิธี ข้อ 3.4.4.1 มาละลายด้วย 50%เอทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทำการเตรียมคอลัมน์กระบอกฉีดยาโดยการนำสำลีอุดไว้บริเวณช่วงปลายคอลัมน์กระบอกฉีดยา เติมซิลิกาเจล (Silica gel) ลงในคอลัมน์กระบอกฉีดยา 30 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 30 มิลลิลิตร ทำการอัดแรงดันอากาศเข้าไปในคอลัมน์กระบอกฉีดยาเพื่อให้เอทานอลไหลออกมา เติมสารสกัดจากรากหม่อนที่ละลายไว้แล้วลงในคอลัมน์กระบอกฉีดยาปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม เอทานอล (Ethanol) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการอัดแรงดันอากาศเพื่อเก็บตัวอย่างจากนั้นทำซ้ำด้วยวิธีเดิมโดยใช้โมบายเฟส 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้จากการผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยามาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้ง และนำมาละลายด้วย 70%เมทานอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ตามวิธี ข้อ 3.4.1.7

3.4.4.4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography

3.4.4.4.1 การคัดเลือกโมบายเฟสด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

ใช้หลอดรูเล็ก (Capillary tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.05 เซนติเมตร ลงในสารสกัดส่วนรากและส่วนยอด นำไปจุดเหนือปลายด้านล่างของแผ่น TLC ประมาณ 1 เซนติเมตร โดยให้สารสกัดทั้งสองชนิดห่างกันจุดละ 1 เซนติเมตร รอให้แห้ง นำแผ่นTLC วางในแนวตั้งในภาชนะปิด ที่มีโมบายเฟส(เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) 3 แบบ ในอัตราส่วน 1:3,1:1 และ 3:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของโมบายเฟสที่เหมาะสำหรับนำมาทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมบายเฟสทั้ง 3 ชนิด แล้วปล่อยให้โมบายเฟสเคลื่อนที่ขึ้นไปเรื่อย ๆ จนถึงระดับที่กำหนด ยกแผ่น TLC ออกจากภาชนะ นำมาส่องใน UV box ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

3.4.4.4.2 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate))

นำสารสกัดจากรากของต้นหม่อนที่สกัดด้วยวิธีตามวิธี ข้อ 3.4.4.1 มาละลายด้วย 50%เอทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเตรียมคอลัมน์โดยการนำสำลีอุดไว้บริเวณช่วงปลายคอลัมน์ นำSilica gel มาผสมกับโมบายเฟสที่เหมาะสมที่ได้ตามวิธี ข้อ 3.4.4.4.1 จากนั้นลงในคอลัมน์ เปิดวาลว์ให้โมบายเฟสไหลออกมาจากคอลัมน์ เพื่อเป็นการเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมใช้งาน โดยโมบายเฟสจะไหลออกมาจนถึงผิวหน้าของ Silica gel เติมสารสกัดจากรากหม่อน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์รอให้สารสกัดจากรากหม่อนซึมลงในคอลัมน์จนหมด จากนั้นเติมโมบายเฟสที่เหมาะสมที่ได้ตามวิธี ข้อ 3.4.4.4.1 เปิดวาล์วให้โมบายเฟสไหลออกจากคอลัมน์ โดยจะเริ่มเก็บตัวอย่างในช่วงที่สีของสารสกัดจากรากหม่อน อยู่ในช่วงกลางคอลัมน์ โดยจะเก็บตัวอย่างครั้งละประมาณ 30 มิลลิลิตร ต่อขวด โดยจะเก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์จนกว่าจะมีลักษณะสีใส จึงหยุดเก็บ นำตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดที่ได้มาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด นำสารสกัดที่อบแห้งหลังจากผ่านคอลัมน์มาละลายด้วย 100%เมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ตามวิธี ข้อ 3.4.1.7

3.4.4.4.3 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate) และ 50%เอทานอล (50%Ethanol)

นำสารสกัดจากรากของต้นหม่อนที่สกัดด้วยวิธีตามวิธี ข้อ 3.4.4.1 มาละลายด้วย 50%เอทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเตรียมคอลัมน์โดยการนำสำลีอุดไว้บริเวณช่วงปลายคอลัมน์ นำ ซิลิกาเจล (Silica gel) มาผสมกับโมบายเฟสที่เหมาะสมที่ได้ตามวิธี ข้อ 3.4.4.4.1 จากนั้นเทลงในคอลัมน์ เปิดวาลว์ให้โมบายเฟสไหลออกมาจากคอลัมน์ เพื่อเป็นการเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมใช้งาน โดยโมบายเฟสจะไหลออกมาจนถึงผิวหน้าของ ซิลิกาเจล เติมสารสกัดจากรากหม่อน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์รอให้สารสกัดจากรากหม่อนซึมลงในคอลัมน์จนหมด จากนั้นเติม 1 : 3 (เอ

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เปิดวาล์วให้โมบายเฟสไหลออกจากคอลัมน์ โดยจะเริ่มเก็บตัวอย่างในช่วงที่สีของสารสกัดจากรากหม่อน อยู่ในช่วงกลางคอลัมน์ โดยจะเก็บตัวอย่างครั้งละประมาณ 30 มิลลิลิตร ต่อขวด เมื่อโมบายเฟสหมด เติม 50%เอทานอล เรื่อย ๆ จนกว่าตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์จะมีลักษณะสีใส จึงหยุดเก็บ นำตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดมาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด และนำมาละลายด้วย 100%เมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาหาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ตามวิธี ข้อ 3.4.1.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

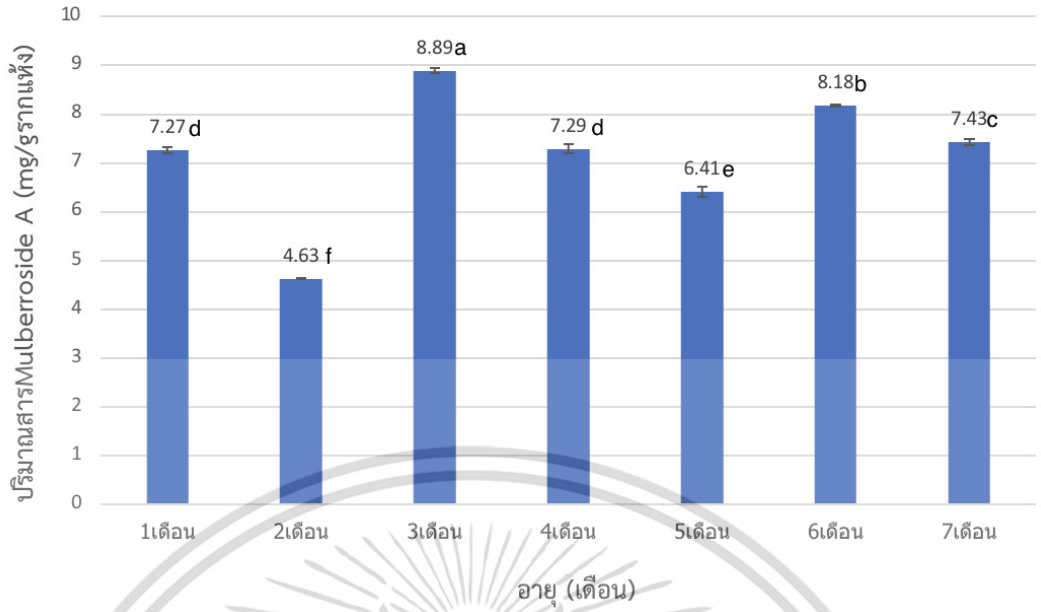
4.1 การศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตร1/4MS ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน

จากตารางที่ 4.1 พบว่า รากของต้นหม่อนในเดือนที่ 1 มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.03 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 7.27 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก ,ในเดือนที่ 2 มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.04 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 4.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในเดือนที่ 3 มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.07 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 8.89 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก , ในเดือนที่ 4 มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.06 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 7.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในเดือนที่ 5 มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.06 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 6.41 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในเดือนที่ 6 มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.05 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 8.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในเดือนที่ 7 มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.08 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 7.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก โดยพบว่ามีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุดในช่วงเดือนที่ 3 และมีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอน้อยที่สุดในช่วงเดือนที่ 2 น้ำหนักรากแห้งในแต่ละเดือนที่ได้นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ร้อยละ 95 ดังแสดงใน รูปที่ 4.1.1 และ รูปที่ 4.1.2

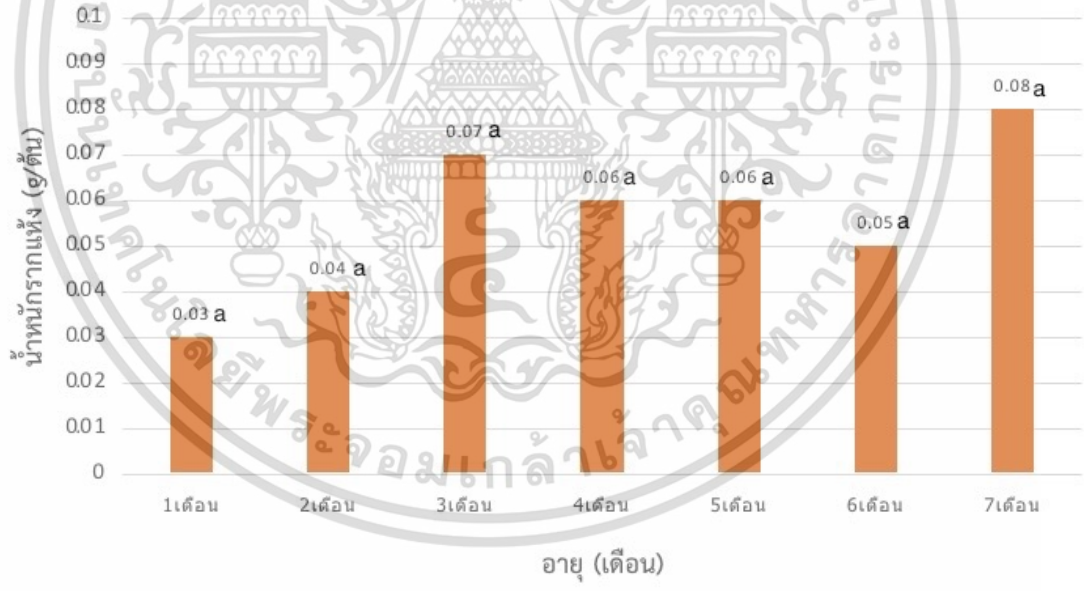
ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอและน้ำหนักแห้งของรากต้นหม่อน ทุก ๆ เดือน ระยะเวลา 7 เดือน

อายุของต้นหม่อน	น้ำหนักรากแห้ง(กรัม/ต้น)	ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (มิลลิกรัม/1กรัมแห้งของราก)
1เดือน	0.03^{a}	7.27^{d}
2เดือน	0.04^{a}	4.63^{f}
3เดือน	0.07^{a}	8.89^{a}
4เดือน	0.06^{a}	7.29^{d}
5เดือน	0.06^{a}	6.41^{e}
6เดือน	0.05^{a}	8.18^{b}
7เดือน	0.08^{a}	7.43^{c}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1.1 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MSทุก ๆ 1 เดือน ระยะเวลา 7 เดือน



รูปที่ 4.1.2 น้ำหนักแห้งต่อต้นที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MSทุก ๆ 1 เดือน ระยะเวลา 7 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

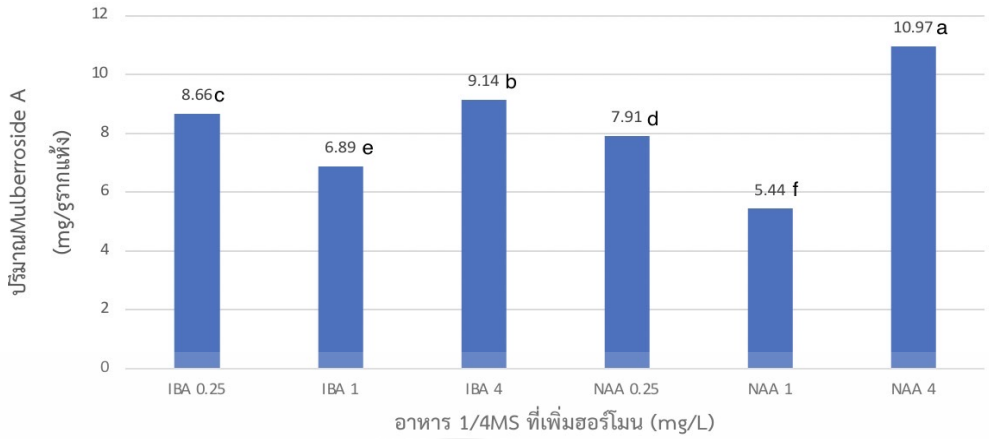
4.2 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA, IBA ต่อการเจริญของรากและปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน

จากตารางที่ 4.2 พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.16 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 8.66มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.13 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 6.89 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.17 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 9.14 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.05 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 7.91 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.03 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 5.44 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.03 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 10.97มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก โดยพบว่ามีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุดในช่วงอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอน้อยที่สุดในช่วงอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักรากแห้งในแต่ละเดือนที่ได้นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ร้อยละ 95 ดังแสดงใน รูปที่ 4.2.1 และรูปที่ 4.2.2

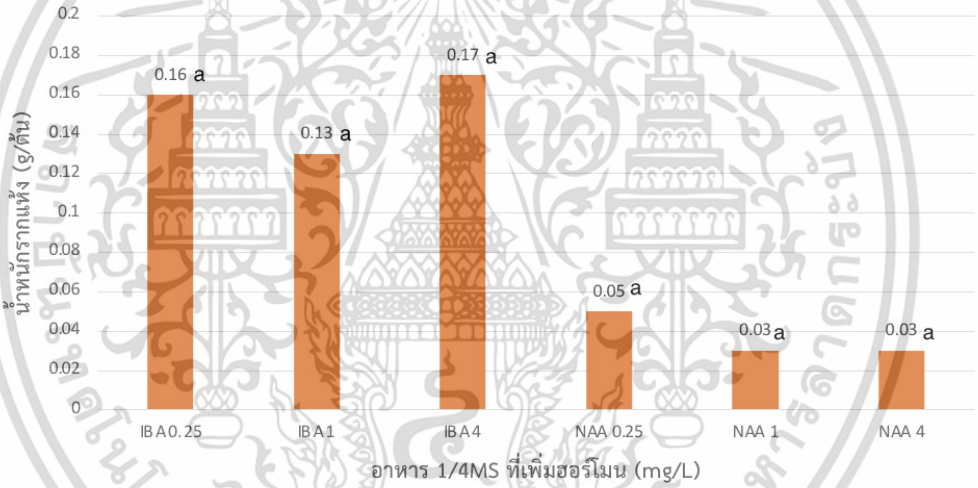
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1/4 MSที่เพิ่มฮอร์โมน NAAและIBA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน	น้ำหนักรากแห้ง(กรัม/ต้น)	ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (มิลลิกรัม/1กรัมแห้งของราก)
1/4MS เพิ่ม IBA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.16^{a}	8.66^{c}
1/4MS เพิ่ม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.13^{a}	6.89^{e}
1/4MS เพิ่ม IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.17^{a}	9.14^{b}
1/4MS เพิ่ม NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.05^{a}	7.91^{d}
1/4MS เพิ่ม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.03^{a}	5.44^{f}
1/4MS เพิ่ม NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.03^{a}	10.97^{a}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2.1 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA และ NAA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน



รูปที่ 4.2.2 น้ำหนักแห้งของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA และ NAA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน

4.2.1 การศึกษา Growth index ของต้นหม่อนในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA เปรียบเทียบกับฮอร์โมนIBA ที่มีความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน

จากตารางที่ 4.2.1 พบว่า ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 2.16 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบเยอะ สีเขียวสด ต้นสูง มีรากเกิดใหม่จำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 1.02 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบเยอะ สีเขียวสด มีรากเกิดใหม่จำนวนมาก, ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth indexเฉลี่ย 0.66 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบสีเหลืองเขียว มีรากเกิดใหม่, ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 0.1 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบสีเหลืองเขียว ไม่พบรากที่เกิดใหม่, ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 0 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบสีเหลือง ใบร่วง ไม่พบรากที่เกิดใหม่, ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 0 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบสีเหลือง ใบร่วง ไม่พบรากที่เกิดใหม่ ดังแสดงใน รูป 4.2.3

ตารางที่ 4.2.1 ค่าเฉลี่ย Growth index ของต้นหม่อนในอาหาร1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA เปรียบเทียบกับฮอร์โมน IBA ที่มีความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ระยะเวลา 1 เดือน

อาหารสูตร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดเริ่มต้น	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสุดท้าย	ค่าเฉลี่ย Growth index ของต้นหม่อน
1/4MS	IBA 0.25	3.94	11.48	2.16 ± 1.30
	IBA 1	3.56	7.10	1.02 ± 0.34
	IBA 4	4.21	6.52	0.66 ± 0.37
	NAA 0.25	3.34	3.35	0.1 ± 0.18
	NAA 1	3.74	2.72	0
	NAA 4	3.26	1.87	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A) (B) (C)

(D) (E) (F)

รูปที่ 4.2.3. ลักษณะที่ของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA เปรียบเทียบกับฮอร์โมน IBA ที่มีความเข้มข้น 0.25, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน รูป (A) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม IBA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (B) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (C) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (D) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (E) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และรูป F แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

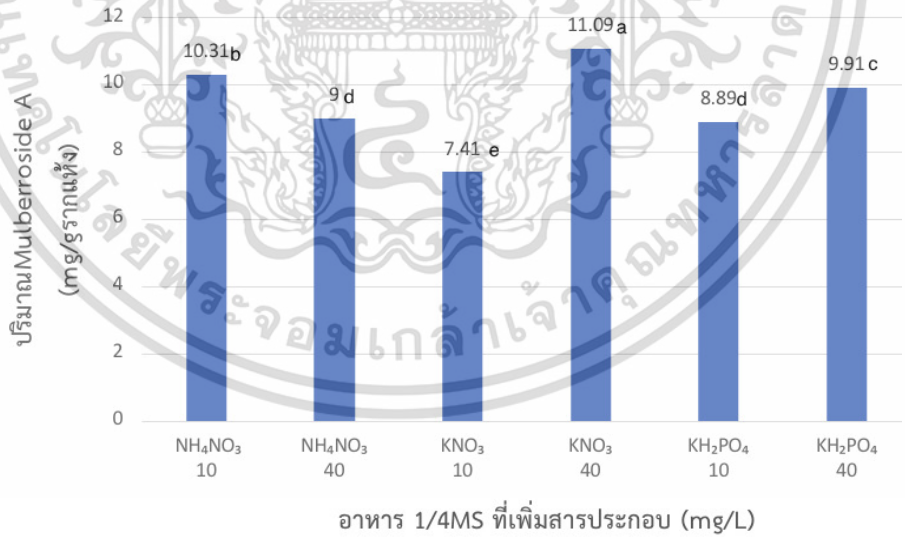
4.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate, Potassium nitrate, Potassium dihydrogen phosphate ต่อการเจริญของรากและสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน

จากตารางที่ 4.3 พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.14 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 10.31 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.13 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium nitrate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.10 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 7.41 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, , ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium nitrate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.13 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 11.09 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก , ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.14 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 8.89 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก, ในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักรากแห้งต้นละ 0.08 กรัม มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 9.91 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของราก โดยพบว่ามีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุดในช่วงอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium nitrate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอน้อยที่สุดในช่วงอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium nitrate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักรากแห้งในแต่ละเดือนที่ได้นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ร้อยละ 95 ดังแสดงใน รูปที่ 4.3.1 และ รูปที่ 4.3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

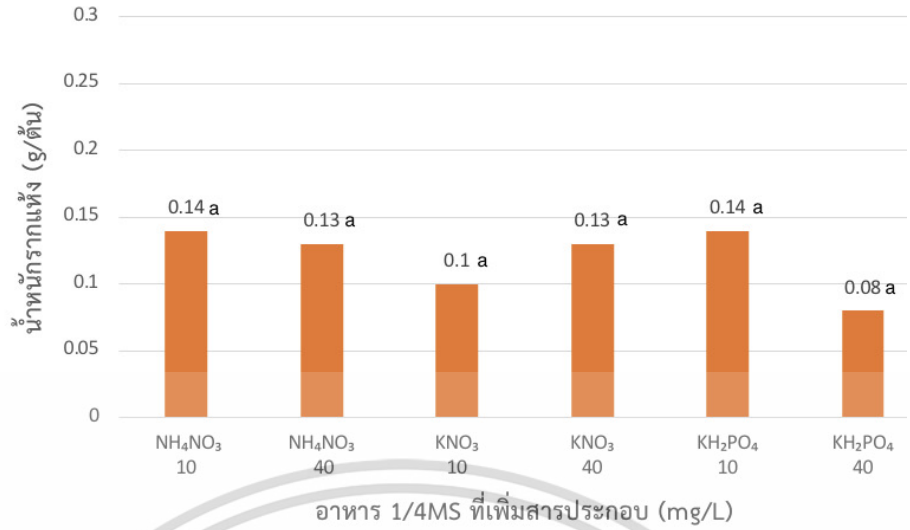
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร1/4 MS ที่เพิ่มสารประกอบ ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของแร่ธาตุ	น้ำหนักรากแห้ง(กรัม/ต้น)	ปริมาณเฉลี่ยของสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนังแห้ง)
1/4MS เพิ่ม NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.14^{a}	10.31^{b}
1/4MS เพิ่ม NH_4NO_3 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.13^{a}	9^{d}
1/4MS เพิ่ม KNO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.10^{a}	7.41^{e}
1/4MS เพิ่ม KNO_3 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.13^{a}	11.09^{a}
1/4MS เพิ่ม KH_2PO_4 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.14^{a}	8.89^{d}
1/4MS เพิ่ม KH_2PO_4 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.08^{a}	9.91^{c}



รูปที่ 4.3.1 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3.2 น้ำหนักแห้งของรากหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน

4.3.1 การศึกษา Growth index ของต้นหม่อนในอาหาร1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3) และPotassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้น 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน

จากตารางที่ 4.3.1 พบว่าต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 3.13 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบเยอะ สีเขียวสด ต้นสูง มีรากเกิดใหม่จำนวนมาก, ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 2.35 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบเยอะ สีเขียวสด ต้นสูง มีรากเกิดใหม่จำนวนมาก ทำการเลี้ยง 5 ซ้ำแต่ต้นหม่อนเหลือรอด 4 ซ้ำ, ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium nitrate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 2.12 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบน้อย สีเขียวสด มีรากเกิดใหม่จำนวนมาก,ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium nitrate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 1.98 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบเยอะ สีเขียวปนเหลือง มีรากเกิดใหม่จำนวนน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่ม Potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 1.92 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบเยอะ สีเขียวปนเหลือง มีรากเกิดใหม่จำนวนน้อย ทำการเลี้ยง 5 ซ้ำแต่ต้นหม่อนเหลือรอด 4 ซ้ำ, ต้นหม่อนที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ในระยะเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่ม Potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มี Growth index เฉลี่ย 1.92 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้มีใบเยอะ สีเขียวปนเหลือง มีรากเกิดใหม่จำนวนน้อย ทำการเลี้ยง 5 ซ้ำ แต่ต้นหม่อนเหลือรอด 2 ซ้ำ ดังแสดงใน รูป 4.3.3

ตารางที่ 4.3.1 ค่าเฉลี่ย Growth index ของต้นหม่อนในอาหาร1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3) และ Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้น 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ระยะเวลา 1 เดือน

อาหารสูตร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดเริ่มต้น	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสุดท้าย	ค่าเฉลี่ย Growth indexของต้นหม่อน
1/4MS	NH_4NO_3 10	2.67	10.64	3.13 ± 1.81
	NH_4NO_3 40	3.03	9.08	2.35 ± 1.97
	KNO_3 10	2.44	9.45	2.12 ± 1.85
	KNO_3 40	2.95	8.64	1.98 ± 1.40
	KH_2PO_4 10	3.03	10.34	1.92 ± 2.53
	KH_2PO_4 40	2.54	9.11	0.85 ± 0.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A) (B) (C)

(D) (E) (F)

รูปที่ 4.3.3 ลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (NH_4NO_3), Potassium nitrate (KNO_3), Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้น 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน ที่รูป (A) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม NH_4NO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (B) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม NH_4NO_3 40 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (C) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม KNO_3 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (D) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม KNO_3 40 มิลลิกรัมต่อลิตร, รูป (E) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม KH_2PO_4 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และรูป (F) แสดงลักษณะของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS เพิ่ม KH_2PO_4 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

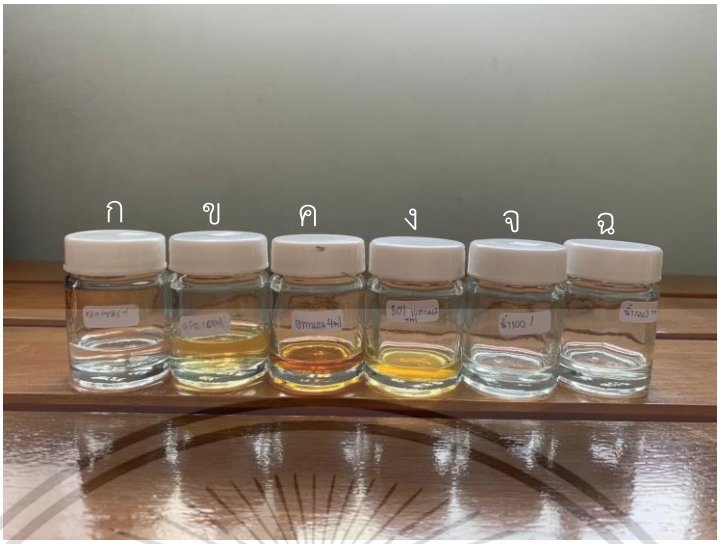
4.4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.4 พบว่า ในช่วงโมบายเฟส เฮกเซน มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 11 PPM, ในช่วงโมบายเฟส เอทิล อะซิเตท มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 715 PPM, ในช่วงโมบายเฟส เอทานอล มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 1273 PPM, ในช่วงโมบายเฟส 50%เอทานอล มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 1414 PPM, ในช่วงโมบายเฟส น้ำครั้งที่ 1 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 137 PPM และ ในช่วงโมบายเฟส น้ำครั้งที่ 2 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 23 PPM ในช่วงที่มากที่สุดที่พบสารมัลเบอร์โรไซด์เอ อยู่ในช่วง 50%เอทานอล และ เอทานอล โดยในช่วง เอทานอลนั้นมีลักษณะสีใส และไม่พบตะกอน ดังแสดงใน รูป 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่อยู่ในโมบายเฟส เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ตามลำดับ ด้วยวิธี Flash column chromatography

โมบายเฟสที่ใช้	**ปริมาณสารmulberroside A ที่ได้ (PPM)**
Hexane	11
Ethyl Acetate	715
Ethanol	1273
50% Ethanol	1414
ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำครั้งที่ 1	137
ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำครั้งที่ 2	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยาที่ใช้โมบายเฟส เฮกเซน(ก) , เอทิล อะซิเตท(ข) , เอทานอล(ค) , 50%เอทานอล(ง) , น้ำครั้งที่1(จ) และ น้ำครั้งที่2(ฉ) ตามลำดับ

4.5 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็นเอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol) และ น้ำ (Water) ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.5 พบว่าการผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยามีการตกตะกอนเกิดขึ้น จึงเก็บแยกเป็นส่วนของตะกอนที่ไม่ละลายในโมบายเฟสต่างๆ ในช่วงตัวอย่างเอทานอลมีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 8.5782 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และในตะกอนที่ไม่ละลายในเอทานอลมีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 42.034 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด, ในช่วงตัวอย่าง 50% เอทานอล มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 57.1061 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และในตะกอนที่ไม่ละลายใน 50% เอทานอล มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 43.7596 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด, ในช่วงตัวอย่างน้ำ มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 54.6303 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และในตะกอนที่ไม่ละลายในน้ำ มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 34.3678 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด จากการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้มีการกระจายตัวอยู่ในทุกช่วงของคอลัมน์ สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์มีลักษณะสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงน้ำตาลเข้ม ดังแสดงใน รูป 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่อยู่ในโมบายเฟส เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol) และ น้ำ (Water) ตามลำดับ ด้วยวิธี Flash column chromatography

โมบายเฟส	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (g)	ค่าการเจือจางก่อนนำไปฉีดHPLC (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้จากเครื่องHPLC (PPM)	ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด)
Ethanol	0.5881	70	72.069	8.5782
50%Ethanol	0.6057	70	494.1312	57.1061
น้ำ	0.8765	100	478.835	54.6303
ตะกอนที่ได้จาก Ethanol	0.1	30	140.1124	42.034
ตะกอนที่ได้จาก 50%Ethanol	0.1011	30	147.4686	43.7596
ตะกอนที่ได้จากน้ำ	0.0143	20	24.5734	34.3678

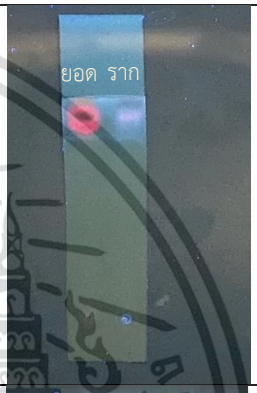
รูปที่ 4.5 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยาที่ได้จาก ตะกอนที่ได้จากเอทานอล(ก) , ตะกอนที่ได้จาก50%เอทานอล(ข) , ตะกอนที่ได้จากน้ำ(ค) , เอทานอล(ง) , 50%เอทานอล(จ) และ น้ำ(ฉ) ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การคัดเลือกโมบายเฟสด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

จากตารางที่ 4.6 พบว่า ในช่วงโมบายเฟสที่ใช้ 1:3 เอทานอล : เอทิล อะซิเตท มีการแยกของสารสกัดรากหม่อนและสารสกัดยอดหม่อน ได้ดีกว่าในช่วงโมบายเฟส 1:1 และ 3:1 เอทานอล : เอทิล อะซิเตท

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบอัตราส่วนของโมบายเฟส (เอทานอล : เอทิล อะซิเตท)

อัตราส่วนโมบายเฟส (เอทานอล : เอทิล อะซิเตท)	**ภาพจากการส่องผ่าน UV Box (ความยาวคลื่น 365 nm)**
3 : 1	
1 : 1	
1 : 3	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

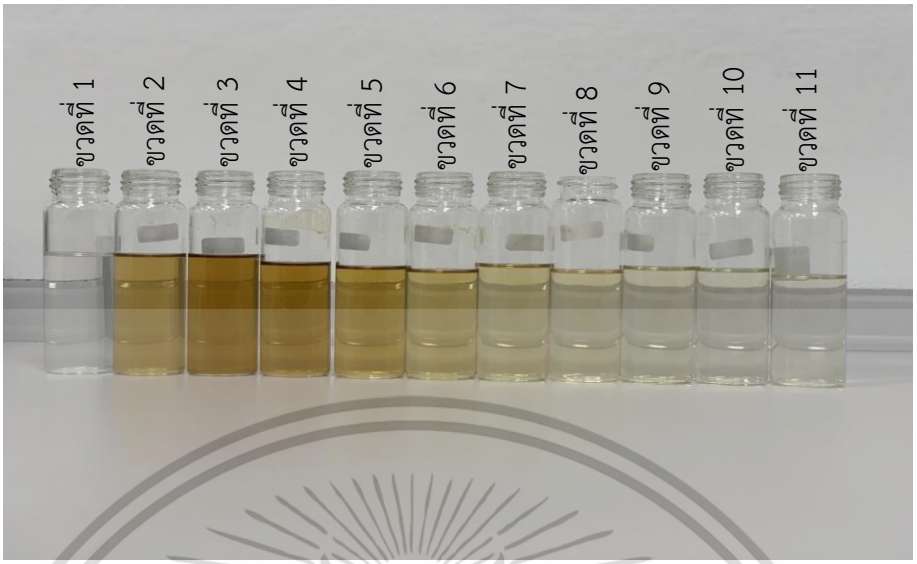
4.7 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate))

จากตารางที่ 4.7 พบว่า ในช่วงขวดที่ 1 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 16.78 มิลลิกรัมต่อ1 กรัมแห้งของสารสกัด,ในช่วงขวดที่ 2 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 10.77 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด ,ในช่วงขวดที่ 3 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 27.85 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 4 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 32.26 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด ,ในช่วงขวดที่ 5 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 50 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด ,ในช่วงขวดที่ 6 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 58.84 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด ,ในช่วงขวดที่ 7 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 72.37 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 8 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 55.39 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 9 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 43.71 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 10 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 41.92 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด และ ในช่วงขวดที่ 11 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 36.81 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด จากการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ อยู่รวมกันมากในช่วงเดียวกัน สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ที่ได้มีลักษณะสีเหลืองใส ไม่มีตะกอน เหมาะสำหรับการต่อยอดเพื่อทำผลึกสารมัลเบอร์โรไซด์เอต่อไป ดัง รูป 4.6

ตารางที่ 4.7 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่อยู่ในขวดเก็บตัวอย่างจากการผ่านคอลัมน์วิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate))

ลำดับ	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (g)	ค่าการเจือจางก่อนนำไปฉีด HPLC (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้จากเครื่องHPLC (PPM)	ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด)
ขวดที่ 1	0.0083	5	27.8536	16.78
ขวดที่ 2	0.0155	5	33.4011	10.77
ขวดที่ 3	0.0275	5	153.1787	27.85
ขวดที่ 4	0.0322	5	207.7331	32.26
ขวดที่ 5	0.306	5	306.0249	50
ขวดที่ 6	0.237	5	278.0951	58.84
ขวดที่ 7	0.0238	5	334.4793	72.37
ขวดที่ 8	0.0304	5	336.7450	55.39
ขวดที่ 9	0.0305	5	100.7175	43.71
ขวดที่ 10	0.0205	5	41.9184	41.92
ขวดที่ 11	0.0215	5	153.2273	36.81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Classical adsorption column chromatography ที่ใช้โมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)

4.8 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟส เป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate) และ 50%เอทานอล (50%Ethanol)

จากตารางที่ 4.8 พบว่า ในช่วงขวดที่ 3 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 15.85 มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 4 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 21.06 มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 8 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 47.84 มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 9 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 47.96 มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 10 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 103.53 มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 11 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 32.54 มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 12 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 25.26 มิลลิกรัมต่อ1กรัมแห้งของสารสกัด, ในช่วงขวดที่ 13 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 39.27 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด และ ในช่วงขวดที่ 14 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 36.77 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งของสารสกัด จากการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ อยู่รวมกันมากในช่วงเดียวกัน สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ในช่วงที่มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอเยอะ มีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม มีตะกอนเยอะ ดังแสดงใน รูป 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่อยู่ในขวดเก็บตัวอย่างจากการผ่านคอลัมน์วิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) และ 50%เอทานอล

ลำดับ	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (g)	ค่าการเจือจางก่อนนำไปฉีด HPLC (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้จากเครื่องHPLC (PPM)	ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด)
ขวดที่ 3	0.0153	5	48.4987	15.85
ขวดที่ 4	0.0124	5	52.2326	21.06
ขวดที่ 8	0.0088	5	84.1905	47.84
ขวดที่ 9	0.0105	5	100.7157	47.96
ขวดที่ 10	0.1576	50	326.3289	103.53
ขวดที่ 11	0.8896	100	289.5019	32.54
ขวดที่ 12	0.7133	100	180.1494	25.26
ขวดที่ 13	0.2204	100	86.5522	39.27
ขวดที่ 14	0.0352	10	129.2382	36.77

รูปที่ 4.7 สีของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Classical adsorption column chromatography โดยโมบายเฟส 1 : 3 เอทานอล : เอทิล อะซิเตท และ 50%เอาทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหารสูตร1/4MS ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน

โดยการนำรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ ทุก ๆ เดือนระยะเวลา 7 เดือน นำมาทำการสกัดโดยใช้วิธี Soxhlet Extraction โดยใช้โมบายเฟสเป็นเมทานอล นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด จนกว่าจะแห้ง นำมาละลายกลับด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ที่ได้ในแต่ละเดือนนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างชัดเจนในทางสถิติที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ95 โดยเดือนที่มีสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุดจะอยู่ในช่วงเดือนที่ 3 ที่มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 8.89 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง และน้อยที่สุดในช่วงเดือนที่ 2 ที่มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ เพียง 4.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง และปริมาณรากที่เลี้ยงในแต่ละเดือนทั้งหมด 7 เดือนนั้นพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

5.1.2 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้น 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA, IBA ต่อการเจริญของรากและปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน

โดยการนำรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร1/4 MS ที่เพิ่มฮอร์โมนNAAและIBA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน พบว่าต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าฉลี่ย Growth index มากที่สุด 2.16 ลักษณะของต้นหม่อนที่ได้สูง ใบสีเขียวสด มีรากที่เกิดใหม่เพิ่มมากขึ้น ในส่วนของต้นหม่อนที่เพิ่มฮอร์โมน IBA ในความเข้มข้นอื่นนั้นมีลักษณะใบเขียวสดสีสวย แต่ค่า Growth index ของต้นหม่อนนั้นยังไม่มีความเปลี่ยนแปลง ในส่วนของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันนั้นพบว่าต้นหม่อนมีลักษณะใบสีเหลือง มีใบร่วง ความยาวของต้นเท่าเดิมไม่มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น และมีต้นหม่อนบางส่วนที่ตายอีกด้วย จากนั้นนำรากหม่อนมาทำการสกัดโดยใช้วิธี Soxhlet Extraction โดยใช้โมบายเฟสเป็นเมทานอล นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด จนกว่าจะแห้ง นำมาละลายกลับด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ที่ได้ในแต่ละเดือนนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างชัดเจนในทางสถิติที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ95 โดยเดือนที่มีสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุดจะอยู่ในช่วงอาหารสูตร 1/4MS เพิ่ม NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 10.97 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง และน้อยที่สุดในช่วง อาหารสูตร 1/4MS เพิ่ม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ เพียง 5.44 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง และปริมาณรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วย1/4MS ที่เพิ่มฮอร์โมน NAAและIBA ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน นั้นพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ95

5.1.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหารสูตร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate, Potassium nitrate, Potassium dihydrogen phosphate ต่อการเจริญของรากและสารมัลเบอร์โรไซด์เอในรากของต้นหม่อน ระยะเวลาการเลี้ยง 1 เดือน

โดยการนำรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate, Potassium nitrate, Potassium dihydrogen phosphate ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน พบว่าต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate (N) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ย Growth index 3.13 ลักษณะของต้นหม่อนมีใบสีเขียวสด มีรากที่เกิดใหม่เพิ่มมากขึ้น ในส่วนของต้นหม่อนที่เพิ่มสารประกอบชนิดอื่นและในความเข้มข้นอื่นนั้น มีลักษณะใบเขียวสดสีสวย แต่ ค่าเฉลี่ยGrowth index ของต้นหม่อนนั้นอยู่ในช่วง 1.92 – 2.35 ในส่วนของต้นหม่อนที่เลี้ยงในอาหาร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Potassium dihydrogen phosphate ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำการเลี้ยงจำนวน 5 ต้นนั้น มีต้นหม่อนตายถึง 3 ต้น Growth index ที่ได้นั้นไม่มีความเปลี่ยนแปลง จากนั้นนำรากหม่อนมาทำการสกัดโดยใช้วิธี Soxhlet Extraction โดยใช้โมบายเฟสเป็นเมทานอล นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด เป็นเวลา 1-2วัน นำมาละลายกลับด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ที่ได้ในแต่ละเดือนนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างชัดเจนในทางสถิติที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ95 โดยเดือนที่มีสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุดจะอยู่ในช่วงอาหารสูตร 1/4MS เพิ่ม Potassium nitrate 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 11.09 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง และน้อยที่สุดในช่วงอาหาร 1/4MS เพิ่ม Potassium nitrate 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ เพียง 7.41 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักรากแห้ง และปริมาณรากของต้นหม่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 1/4MS ที่เพิ่มสารประกอบ Ammonium nitrate, Potassium nitrate, Potassium dihydrogen phosphate ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ระยะเวลา 1 เดือน นั้นพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ตามลำดับ

โดยการนำสารสกัดจากรากต้นหม่อนที่สกัดด้วยวิธี Reflux extraction อบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด และละลายกลับด้วย 50%เอทานอล ผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยาด้วยการใช้โมบายเฟส เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate), เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) นำไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยา นำมาละลายกลับด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร นั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ มากที่สุดจะอยู่ในช่วงของ50% เอทานอล มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 1414 PPM และรองลงมาจะอยู่ในช่วงของเอทานอล มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 1273 PPM และในช่วงที่น้อยที่สุดนั้น อยู่ในช่วงของ เฮกเซน จะมีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ เพียง 11 PPM โดยวิธีนี้ในช่วงเอทานอลที่พบสารมัลเบอร์โรไซด์เอนั้นมีลักษณะสีที่เหลืองใส มากกว่าในช่วง 50%เอทานอล ที่พบปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุด

5.1.5 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Flash column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ตามลำดับ

โดยการนำสารสกัดจากรากต้นหม่อนที่สกัดด้วยวิธี Reflux extraction มาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้ง และละลายกลับด้วย 50%เอทานอล ผ่านคอลัมกระบอกฉีดยาด้วยการใช้โมบายเฟส เอทานอล (Ethanol), 50%เอทานอล (50%Ethanol), น้ำ (Water) ตามลำดับ นำไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์กระบอกฉีดยา นำมาละลายกลับด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณมัลเบอร์โรไซด์เอมากที่สุดจะอยู่ในช่วงของ 50% เอทานอล มีปริมาณมัลเบอร์โรไซด์เอ 57.1061 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และรองลงมาจะอยู่ในช่วงของน้ำ มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 54.6303 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และน้อยที่สุดอยู่ในช่วงของเอทานอล จะมีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอเพียง 8.5782 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด โดยในวิธีนี้ทำให้มีตะกอนของสารสกัดรากหม่อนตกลงมาเป็นจำนวนมาก ในทุกช่วงของการผ่านคอลัมน์ และ สารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้นั้นมีลักษณะกระจายตัว อยู่ในทุกช่วงของโมบายเฟสที่ผ่านคอลัมน์ ทำให้ยังไม่สามารถทำบริสุทิ์บางส่วนของสารสกัดรากหม่อนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.6 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)

โดยการนำสารสกัดจากรากต้นหม่อนที่สกัดด้วยวิธี Reflux extraction มาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด และละลายกลับด้วย 50%เอทานอล ผ่านคอลัมด้วยการใช้โมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) นำไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ ละลายกลับด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ มากที่สุดจะอยู่ในช่วงขวดที่ 7 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 72.37 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และรองลงมาจะอยู่ในช่วงขวดที่ 6 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 58.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และน้อยที่สุดอยู่ในช่วงขวดที่ 1 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ เพียง 16.78 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด โดยในวิธีนี้ทำให้สารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้อยู่ในช่วงเดียวกันในปริมาณที่มากและมีลักษณะสีที่ใส ไม่มีตะกอนเหมาะสำหรับการนำมาทำให้เกิดผลึกต่อได้

5.1.7 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Classical adsorption column chromatography โดยใช้โมบายเฟสเป็น 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)) และ 50% เอทานอล (50%Ethanol)

โดยการนำสารสกัดจากรากต้นหม่อนที่สกัดด้วยวิธี Reflux extraction มาอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด และละลายกลับด้วย 50%เอทานอล จากนั้นผ่านคอลัมด้วยการใช้โมบายเฟส 1 : 3 (เอทานอล (Ethanol) : เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate) และ 50%เอทานอล (50%Ethanol)) นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ นำมาละลายกลับด้วย 70% เมทานอล ที่ทราบปริมาตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ มากที่สุดจะอยู่ในช่วงขวดที่ 10 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 103.53 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด รองลงมาจะอยู่ในช่วงขวดที่ 9 มีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ 47.96 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และในช่วงที่น้อยที่สุดนั้น อยู่ในช่วงขวดที่ 3 จะมีปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ เพียง 15.85 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด โดยในวิธีนี้ทำให้สารมัลเบอร์โรไซด์เอที่ได้อยู่ในช่วงเดียวกันในจำนวนมาก แต่ไม่สามารถทำให้ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์บริสุทธิ์ได้เพราะมีตะกอนจากสารสกัดรากหม่อนอยู่จำนวนมาก เป็นตะกอนสีน้ำตาล ทำให้ยังไม่สามารถทำบริสุทิ์บางส่วของสารสกัดรากหม่อนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรใช้รากของต้นหม่อนในปริมาณที่เยอะขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ มีปริมาณมากขึ้น

5.2.2 การเก็บรากของต้นหม่อนทุก ๆ เดือน ในระยะเวลา 7 เดือน พบว่าปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ ที่ได้นั้นมีค่าที่คงที่เสมอ ในการทดลองครั้งต่อไปอาจจะลองปรับเปลี่ยนเป็นการเก็บรากในระยะเวลาที่นานขึ้นเช่นทุก ๆ 3 เดือน อาจจะทำให้รากหม่อนมีปริมาณมัลเบอร์โรไซด์เอ มากขึ้น

5.2.3 ในการปรับปรุงคอลัมน์ครั้งต่อไป อาจจะนำวิธี Flash column chromatography มาใช้แทนวิธี column chromatography แบบดั้งเดิม เพราะว่าทำให้ประหยัดเวลาในการวิจัยและมีประสิทธิภาพในการทำงานมากขึ้น

5.2.4 ในการปรับปรุงครั้งต่อไปอาจจะเลือกโมบายเฟสเป็น เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate) และ เอทานอล (Ethanol) เพราะทำให้ได้ปริมาณสารมัลเบอร์โรไซด์เอ อยู่ในช่วงเดียวกันมาก ๆ และยังสามารถกำจัดตะกอนที่เกิดในรากหม่อนให้มีปริมาณที่น้อยลง ทำให้สารมัลเบอร์โรไซด์เอ ที่ผ่านคอลัมน์มานั้นมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จักรพันธ์ โคมัยกุล,บุญชู ศรีตุลารักษ์, ฮิโรยูกิ ทานากะ, ธฤตา กิติศรีปัญญา, กรวิทย์ อยู่สกุล, เพชรวรินทร์, หวังศุภดิลก , อังคณา สำแดงไฟ และ วราภรณ์ ภูตะลุน. 2013.การประเมินการผลิตสารมัลเบอร์โรไซด์เอและฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราเอนโดไฟต์ และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหม่อน,คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 5 :1-2

เจนจิรา ชุมภูคำ, พรรณวิภา อรุณจิตต์ และอารยา อาจเจริญ เทียนหอม. 2557. ผลของ IBA และ NAA ต่อการเกิดรากและการแตกยอดในกิ่งปักชำหม่อนพันธุ์เชียงใหม่ 60, แก่นเกษตร, 42 : 3

จุลินต์ตา ดรอินทร. 2565. เทคนิคการสกัดด้วยการรีฟลักซ์, ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, : 10

ชัยวัฒน์ วามวรรตัน. 2564.a โครมาโทกราฟีหลักการดูดซับ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : 83-85

ชัยวัฒน์ วามวรรตัน. 2564.b การแยกกรดอะมิโนด้วยยโครมาโทกราฟีหลักการการแบ่งส่วน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : 76-78

ยลดา ศรีเศรษฐ์, กนกวรรณ จารุกำจร และวรัญญา จตุพรประเสริฐ. 2559. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหม่อน, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ว.เภสัชศาสตรอีสาน, 12 : 14-27

ยศพณ พวนศิริ. 2564. ผลของการใช้ใบหม่อนหมักต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต คุณภาพซากและคุณภาพเนื้อในไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดา, วิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ, : 10-12

ยุทธนา วรวุธ, กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ, วันชัย ดีเอกนามกูล และ ปรียานุช ดวงละออ 2566. เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง, ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, : 74-75

วิภพ สุทธนะ. 2556. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์:กลไกการออกฤทธิ์. ศรีนครินทร์เวชสาร, 28(4), 567-582.

วิโรจน์ แก้วเรือง. 2555. หม่อนผลไม้เภสัชโภชนาภัณฑ์, บทความพิเศษกรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 397 : 31-32

วีรวรรณ เรืองยุทธิการณ์. 2538. การตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยวิธีโคมาโทกราฟี, วรสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่.

ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม .2564 . เทคนิคสกัดสารด้วยซอกห์เลต, สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก.ม. เกษตรศาสตร์.

อัจฉรา แก้วน้อย , อ้อมบุญ วัลลิสุต , สุรัสวดี ปิยะวิริยะกุล และ มาลินี เบ็ญพาด. 2020. ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัดจากเปลือกรากหม่อน, วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธาน.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

อรัญญา ศรีบุศราคัม. 2557. ใบหม่อนกับโรคเบาหวาน. จุลสารข้อมูลสมุนไพร, 32(1), 9.

อานวย เลี้ยวธารากุล, ปราณี รอดเทียม, ชัยโรจน์ โพธิ์เจริญ และสุวิทย์ โชตินันท์. 2555,การพัฒนาระบบการผลิตไก่ประดู่หางดาเชียงใหม่สู่อาหารปลอดภัยต่อผู้บริโภค, สานักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

Anis, M., Faisal, M. and Singh, S.K. 2003. Micropropagation of Mulberry (*Morus alba L.*) Through In vitro Culture of Shoot tip and Nodal Explants.

Chang, L.W., Juang, L.J. and Wang, B.S. 2011. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba L.*) twigs and root bark. Food Chem Toxicol. ; 49: 785-779.

Chuanasa,T., Phromjai, J., Lipipun,V., Likhitwitayawuid, K., Suzuki, M. and Pramyothin, P. 2008. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from thai medicine plant: metabolism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV- 1 infection in mice. Antivir Res. ; 80 : 62-70

Fernanda, M., Girard, C., Knight, P. and Hopfgarpner, G. 2023. Vacuum differential mobility spectrometry combined with column-switching liquid chromatography- mass spectrometry for the analysis of pyrrolizidine alkaloids in tea samples, Journal of Chromatography A, : 1-2

Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamasaki, Y., Shiwaku, K. and Yamane, Y. 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba L.*) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.

Kim, J.K., Kim, M., Cho, S., Kim, M.K., Kim, S.W. and Lim, Y.H. 2010. Biotransformation of mulberroside A from Morus alba result in enhancement of tyrosinase inhibition. J Ind Microbiol Biotechnol. ; 37: 631-637

Likhitwitayawuid , K., Sornsute, A., Sritularaka, B. and Ploypradith, P. 2006. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'–tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. Bioorg Med Chem Lett. ; 16: 5650-5653.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

Lipipun, V., Sasivimolphan, P. and Yoshida, Y. 2011. Topical cream- based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV- 1 infection in mice. Antivir Res. ; 91: 154-160.

Mansoor, M.A. 2005.$_a$ Ion Exchange Chromatography (IELC), ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, : 2

Mansoor, M.A. 2005.$_b$ Size exclusion liquid chromatography (SELC), ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, :3

Price,K.R.,Curl,C.L. and Fenwick,G.R.1987.Flask chromatography-A simple technique of potential value to the food chemist.Food Chemistry,25 : 145-153

Pawlowska, A.M., Oleszek, W. and Braca, A. 2008. Quali-Quantitive Analyses of Flavonoids of *Morus nigra L.* and *Morus alba L*. (Moraceae) Fruits. Journal of Agricultural and FoodChemistry.56:3377-3380.

Shi, L. and Zhang, Z. 2010. Anti-inflammatory and analgesic properties of cis-mulberroside A from Ramolus mori. Fitoterapia. ; 81: 214-218.

Xu, X., Huang, Y., Xu, J., He, X. and Wang, Y. 2020. Anti-neuroinflammatory and antioxidant phenols from mulberry fruit T (Morus alba L.) School of Pharmacy Guangdong Pharmaceutical University.

Yen, G.C., Fang, S.C. and Hsu, C.L. 2008. Anti- inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of Artocarpus heterophyllus. J Agric Food Chem. ; 56: 4463-4468.

Zhang, Z., Jin, J. and Shi, L. 2008. Protective function of cis-mulberroside A and oxyresveratrol from Ramulus mori against ethanol- induced hepatic damage. Environ Toxicol Phar. ; 26: 325-330.

Zhou, J., Li, S. and Wang, W. 2013. Mulberroside A. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 30 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว พรรณภัทร ช้างป่าดี รหัสประจำตัว 62050518
นางสาว สุพิชญา สุภาวะ รหัสประจำตัว 62050548
นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่า
โครงงานพิเศษ เรื่อง
ชื่อภาษาไทย การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดจากรากต้นหม่อน
ชื่อภาษาอังกฤษ PARTIAL PURIFICATION OF *MORUS ALBA* ROOT EXTRACTS
ปีการศึกษา 2565
เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 5.38 %

ลงชื่อ พรรณภัทร
(นางสาว พรรณภัทร ช้างป่าดี)
นักศึกษา

ลงชื่อ สุพิชญา
(นางสาว สุพิชญา สุภาวะ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบ
โครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหา
สมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ พนา โลหะทรัพย์ทวี
(ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี).
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้